

**Über die Inhaltsstoffe von Taraxacum officinale Web.
und Chrysanthemum vulgare Bernh.
(=Tanacetum vulgare)**

Helmut Berberich

1961

Über die Inhaltsstoffe von Taraxacum officinale Web.
und Chrysanthemum vulgare Bernh. (= Tanacetum vulgare)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Helmut Berberich
aus
Regensburg

Januar 1961



Berichterstatter: Prof. Dr. L. Hörhammer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 2. 1961

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Bisher bekannte therapeutische Anwendungsmöglichkeiten und Inhaltsstoffe von <i>Taraxacum officinale</i> Web. und <i>Chrysanthemum vulgare</i> Bernh.	2
B. Eigene Untersuchungen	4
I. Vorversuche	4
1. Wässeriger Extrakt	4
2. Fraktionierte Ausschüttelung mit organischen Lö- sungsmitteln	5
II. Isolierungsversuch der Flavonglykoside aus Flores Ta- raxaci	5
1. Zuordnung der einzelnen Glykoside zu ihren Aglyko- nen	7
2. Chromatographische Feststellung von drei Aglykonen	8
3. Isolierung von Luteolin aus Flores Taraxaci . . .	8
a) Identifizierung des Aglykons als Luteolin . . .	9
b) Identifizierung der Zuckerkomponente	9
III. Isolierung von Luteolin-7-glucosid aus Flores Tanaceti	10
1. Ausschüttelung mit organischen Lösungsmitteln und Herstellung von Mischkristallisat	11
2. Reinigung des Mischkristallisates durch Magnesol- Säulen	12
3. Trennung an Polyamid-Säulen	12
4. Konstitutionsermittlung von Glykosid D	14
5. Klärung der Zuckerstellung in C-7 Position	15
6. Hydrolyse der Gesamtglykoside von Flores Tanaceti	16
IV. Über meso-Inosit aus <i>Taraxacum officinale</i> Web. . . .	17
1. Isolierung von meso-Inosit aus Flores Taraxaci . .	17
2. Identifizierung der isolierten Substanz als meso- Inosit	18
3. Weitere Untersuchungen der einzelnen Drogenteile von <i>Taraxacum officinale</i> Web. auf meso-Inosit . .	20
4. Vorkommen von meso-Inosit und seine physiologische und therapeutische Bedeutung	21
5. Einwirkung von meso-Inosit auf Wachstum und Meta- morphose der Kaulquappen	24

V. Untersuchungen über Pflanzensäuren aus Flores	
Taraxaci	28
1. Abtrennung der Säuren von den übrigen Stoffen . .	28
2. UV-absorptionsspektrophotometrische Messungen und Hydrolyse der Säuren	29
VI. Untersuchung des ätherischen Öles aus Flores Tanaceti mittels Dünnschichtchromatographie	31
VII. Prüfung auf Alkaloide in Chrysanthemum vulgare Bernh. und Taraxacum officinale Web.	31
VIII. Prüfung auf östrogene Stoffe in Taraxacum officinale Web.	32
IX. Testung der Flavonglykoside und Aglykone von Taraxa- cum officinale Web. und Chrysanthemum vulgare Bernh. auf ihre spasmolytische Wirkung	33
DISKUSSION	37
EXPERIMENTELLER TEIL	40
I. Papierchromatographie	40
1. Fließmittelsysteme	40
2. Sprühreagenzien	40
3. Präparative Papierchromatographie	43
II. Säulenchromatographie	43
1. Magnesol-Säule	43
2. Polyamid-Säule	44
3. Aluminiumoxyd-Säule	45
4. Zellulose-Säule	45
III. Dünnschichtchromatographie	46
IV. Herstellung des wässerigen Extraktes	47
V. Bleifällungen	48
VI. Ausschüttelungen	49
VII. Hydrolysen	49
VIII. Papierchromatographische Zuckeruntersuchungen und Osazon-Darstellung	51
IX. Azetylierungen	52

X. UV-absorptionsspektrophotometrische Untersuchungen mit Natriumazetat und Borsäure/Natriumazetat . . .	52
XI. Untersuchungsmethoden	52
XII. Spezielle experimentelle Befunde	53
1. Luteolin aus Flores Taraxaci	53
2. Luteolin-7-glucosid aus Flores Tanacetii	54
3. Luteolin aus der Hydrolyse der Gesamtglykoside von Flores Tanacetii	55
4. Meso-Inosit aus Taraxacum officinale Web. . . .	56
5. Daten des Kaulquappen-Testes mit meso-Inosit . .	57
6. Angaben über die Spasmolyse-Teste	58

E I N L E I T U N G

Löwenzahn (*Taraxacum officinale* Web.) und Rainfarn (*Chrysanthemum vulgare* Bernh.) sind seit dem Mittelalter bekannte und geschätzte Drogen.

Der Löwenzahn fand in der Volksmedizin in Form von Abkochungen als Leber-Galle-Mittel vielfach Verwendung. Über die für diese Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoffe besteht aber bis heute trotz zahlreicher Arbeiten keine klare Vorstellung. Bessere Kenntnisse liegen über den Rainfarn vor, aus dessen ätherischem Öl eine Reihe wurmwirksamer Bestandteile isoliert werden konnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, diese beiden Drogen erneut chemisch zu untersuchen, soweit möglich weitere Inhaltsstoffe zu isolieren und pharmakologisch zu prüfen, worauf im einzelnen die Leber-Galle-Wirksamkeit des Löwenzahns und die dem Rainfarn zugeschriebenen Wirkungen zurückgeführt werden können.

Ausgehend von den Angaben W.J. KIRMAYER'S¹⁾, der bei seinen systematischen Untersuchungen über Flavoninhaltsstoffe der Compositen auch papierchromatographische Angaben über Flavonoide aus *Taraxacum officinale* und *Chrysanthemum vulgare* gemacht hatte, sollten in erster Linie die Flavone besondere Aufmerksamkeit finden, da über die Spasmolysewirkung einiger Flavonoide schon seit einigen Jahren immer wieder berichtet wird.

1) W.J.KIRMAYER, Dissertation, München (1959)

ALLGEMEINER TEIL

A. Bisher bekannte therapeutische Anwendungsmöglichkeiten und Inhaltsstoffe von Taraxacum officinale Web. und Chrysanthemum vulgare Bernh.

Der Löwenzahn, der schon von den arabischen Ärzten des frühen Mittelalters verwendet wurde, ist heute als Radix Taraxaci cum Herba in das Erg.B. zum DAB 6 aufgenommen.

G. MADAUS²⁾ gibt eine Zusammenstellung der Anwendungsgebiete des Löwenzahns, wobei die Reihenfolge der Anwendungshäufigkeit entspricht: 1. Leber- und Gallenleiden (52%), Cholelithiasis und Ikterus inbegriffen, 2. Diabetes mellitus, 3. Blutreinigungsmittel, 4. Magen- und Darmleiden, 5. Nephro- und Cystopathien, 6. Hämorrhoiden und 7. Enuresis. Im übrigen soll Taraxacum noch Bedeutung besitzen als "Amarum" und "Purgans".

Als Inhaltsstoffe der Wurzel werden von F.B. POWER und H. BROWNING³⁾ folgende Verbindungen angegeben: Kaffeesäure, p-Hydroxyphenyllessigsäure, Cholin, Bitterstoff Taraxin = Taraxasterol + Homotaraxasterol, Cluytianol, Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Melissinsäure, Cerotinsäure, geringe Mengen ätherisches Öl und Amygdalinase (=Tyrosinase). K. HESS und Chr. HESS⁴⁾ bestreiten die Aussage von J. ZELLNER⁵⁾, daß der Milchsafte der Droge kautschukhaltig sei. J. ZELLNER gibt ferner an: Taraxasterol= α -Lactuceryl, Homotaraxasterol= β -Lactuceryl, Cerylalkohol, Glycerin und Weinsäure. S. BURROWS und J.C. E.SIMPSON⁶⁾ isolierten aus dem Wurzelmilchsafte β -Amyrin, Stigmasterin, β -Sitosterin, Homotaraxasterol = Taraxol + Taraxeryl + ψ -Taraxasterol.

2) G.MADAUS, "Lehrbuch der biologischen Heilmittel", Bd.III, S. 2680, Leipzig 1938

3) F.B.POWER u. H.BROWNING, J.chem.Soc., 101, 2411, London 1912

4) K.HESS u. CHR.HESS, Chem.Ber. 81, 340 (1948)

5) J.ZELLNER, Mh.Chem. 47, 681 (1927)

6) S.BURROWS u. J.C.E.SIMPSON, J.chem.Soc. 2042, London 1938

Vitamin A wird von H. HERTWIG⁷⁾, Vitamin D von G. MADAUS⁸⁾ erwähnt, die Vitamine B und C von L. KROEBER⁹⁾. Ferner wurde von F. ROLLERI¹⁰⁾ Nicotinsäure in der Wurzel festgestellt. R. KUHN und E. LEDERER¹¹⁾ isolierten aus Löwenzahnblüten Taraxanthin, Lutein und verestertes Violaxanthin. P. KARRER und J. RUTSCHMANN¹²⁾ fanden ebenfalls in den Blüten Flavoxanthin, I. ZIMMERMANN¹³⁾ Arnidiol und Faradiol. Bekannt ist der hohe Inulin- und Zuckergehalt der Droge (im Herbst bis zu 40% Inulin). G. MADAUS⁸⁾ gibt auch Inosit als wirksamen Bestandteil an.

W.J. KIRMAYER¹⁴⁾ stellte chromatographisch das Vorhandensein von drei Luteolinglykosiden in Kraut und Blüten von *Taraxacum officinale* fest.

Auch der Rainfarn, der erstmals im "Capitulare" Karls des Großen erwähnt wird, war schon im Mittelalter ein vielgerühmtes Heilmittel.

Flores bzw. Herba Tanaceti gelangen heute in der Heilkunde innerlich als Anthelminthicum¹⁵⁾ gegen Ascariden und Oxyuren zur Anwendung. Oleum Tanaceti wird äußerlich, mit fettem, indifferenterm Öl vermischt, als Hautreizmittel gegen Rheuma und Gicht und Decoctum Herba Tanaceti als Antiparasiticum gebraucht.

An Inhaltsstoffen sind nach F. BERGER¹⁶⁾ bekannt: Ätherisches Öl, das bis zu 70% aus Thujon, Pinen oder Kamphen, l-Kampher, Borneol und Thujylalkohol besteht. Die Bitterstoffe Tanacetin I und II, sowie Wachs, Fett, Gummi, Apfel-, Wein- und Buttersäure.

R. JARETZKY und F. KÜHNE¹⁷⁾ konnten weder ein vermutetes Saponin noch Tanacet- und Gallussäure oder ein Alkaloid¹⁸⁾ nachweisen.

W.J. KIRMAYER¹⁴⁾ stellte chromatographisch fünf Flavonglykoside in Flores Tanaceti fest.

-
- 7) H. HERTWIG, "Gesund durch Heilpflanzen", Berlin 1938
8) G. MADAUS, "Lehrbuch der biologischen Heilmittel", Bd. III, S. 2679, Leipzig 1938
9) L. KROEBER, Pharmazie 5, 532 (1952)
10) F. ROLLERI, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 281, 118 (1943)
11) R. KUHN u. E. LEDERER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 200, 106 (1931)
12) P. KARRER u. J. RUTSCHMANN, Helv. Chim. Acta 25, 1444 (1942)
13) I. ZIMMERMANN, Helv. Chim. Acta 24, 393 (1941)
14) W. J. KIRMAYER, Dissertation, München (1959)
15) J. CROUY, Bull. Sci. pharmacol. 35, 481 (1928)
16) F. BERGER, "Handbuch der Drogenkunde", Bd. IV, S. 495, Wien 1954
17) R. JARETZKY u. F. KÜHNE, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 6, 353 (1933)
18) P. SIEDLER, Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 12, 64 (1902)

B. Eigene Untersuchungen

I. Vorversuche

W.J. KIRMAYER¹⁹⁾ beschreibt bei seinen systematischen Untersuchungen über Flavoninhaltsstoffe der Compositen in *Taraxacum officinale* Web. Luteolin-7-glucosid und zwei nicht näher charakterisierte Luteolinglykoside. In *Chrysanthemum vulgare* Bernh. findet er fünf Glykoside: 1. Gossypitrin, 2. ein Glykosid, das sich vom Gossypitrin wahrscheinlich nur durch eine Hydroxy- oder Methoxygruppe unterscheidet, 3. Quercimeritrin, 4. Luteolin-7-glucosid und 5. ein Flavonglykosid mit freiem C-3-OH, dessen Genin Kämpferol oder Isohamnetin sein könnte.

Da die Untersuchungen nur papierchromatographisch durchgeführt worden waren, sollte nun durch Isolierung und Identifizierung der Glykoside die Frage der Anthoxanthinführung dieser Drogen geklärt werden.

Zunächst beschränkten sich die Arbeiten auf Flores *Taraxaci*. Wir gingen von einer selbstgesammelten Blütendroge aus. Um uns ein genaues Bild über die Glykosidverteilung machen zu können, stellten wir einen wässerigen Extrakt her und chromatographierten.

1. Wässeriger Extrakt

Die papierchromatographischen Untersuchungen des wässerigen Extraktes in den Fließmitteln Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) und Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5) waren unbefriedigend. Ein Unterscheid zwischen den dabei angewandten Fließmitteln war nicht zu erkennen. Es zog sich im UV-Licht ein gelb bis dunkelbraun fluoreszierender Streifen mit blauen Flecken durchsetzt vom Startpunkt bis zur Fließmittelfront. Auch nach dem Besprühen mit Aluminiumsulfat- bzw. basischer Bleiazetatlösung lies-

19) W.J.KIRMAYER, Dissertation, München (1959)

sen sich keine einzelnen, scharf umgrenzten Glykosidflecke erkennen.

Ein fraktioniertes Ausschütteln sollte nun zu einem klareren Glykosidbild führen.

2. Fraktionierte Ausschüttelung mit organischen Lösungsmitteln

Am zweckmäßigsten erwiesen sich die Ausschüttelungen mit Äther, Äthylazetat und anschließend mit Äthylazetat-Methanol (9:1). Die einzelnen Fraktionen unterschieden sich zwar untereinander kaum in qualitativer Hinsicht, jedoch konnten jetzt wenigstens fünf einzelnen Glykosidflecke in Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser festgestellt werden.

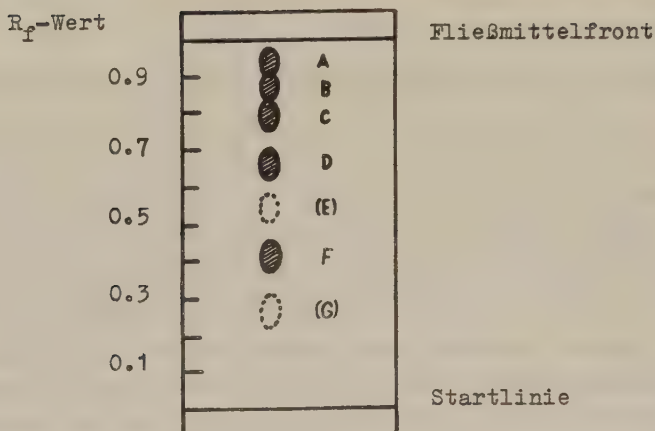
Da die Gewinnung von Mischkristallisaten nur unzureichende Erfolge brachte, suchten wir die Ausschüttelungen durch Säulenchromatographie zu reinigen und zu fraktionieren.

II. Isolierungsversuch der Flavonglykoside aus Flores Taraxaci

Dem ersten folgten zwei weitere Isolierungsversuche, wobei insgesamt 2.5 kg selbstgesamelter, trockener Blütendroge aufgearbeitet wurden. Wir fassen die einzelnen Versuchsanordnungen kurz zusammen.

Nach Vorreinigung der Ausschüttelungen mittels Magnesol-Säulen ergab sich eine Flavonverteilung auf dem Chromatogramm, die wir auf der nächsten Seite skizzenhaft aufgezeichnet haben. Als Fließmittel diente dabei Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3).

Abbildung 1



Die R_F -Werte und die Fluoreszenzfarben unter dem UV-Licht nach Besprühen mit 5%iger wässriger Aluminiumsulfat- bzw. basischer Bleiazetatlösung sind folgende:

Substanz	R_F -Wert	unbesprüht	mit basischem Bleiazetat	mit Aluminiumsulfat
A	0.90	braun	gelbgrün	gelb
B	0.86	braun	gelb	gelb
C	0.80	braun	ocker	gelb
D	0.66	rotbraun	grüngelb	gelb
E	0.49	braungelb	gelborange	gelb
F	0.39	rotbraun	ocker	gelb
G	0.27	gelbbraun	gelborange	gelbgrün

Dabei ließen sich auf Grund der Fluoreszenzfarben und der R_F -Werte einige Flecke ganz bestimmten Aglykonen und Glykosiden zuordnen. Bei B und C lag die Vermutung nahe, daß es sich um Aglykone handeln könnte. Und zwar bei B um Apigenin, bei C um Luteolin. Bei A und D vermuteten wir Apigeninglykoside, bei F ein Luteolin-7-glucosid. Die Farben von E und G konnten wegen der sehr geringen Konzentration nicht genau beurteilt werden.

Wir versuchten nun durch fraktioniertes Ausschütteln mit Äther, Äthylazetat und Äthylazetat-Methanol und darauf folgende Chromatographie an Magnesol-, Perlon- und Zellulose-Säulen eine Isolierung der einzelnen Glykoside herbeizuführen. Unsere Bemühungen blieben jedoch erfolglos. Die Art der Flavonverteilung und die zu geringe Flavonkonzentration dürften der Grund für das Versagen der angewandten Methode gewesen sein.

Mittels der präparativen Papierchromatographie suchten wir nun die Aglykone zu identifizieren.

1. Zuordnung der einzelnen Glykoside zu ihren Aglykonen

Wir fertigten Streifenchromatogramme an, schnitten die einzelnen Zonen aus, eluierten mit Methanol und hydrolysierten anschließend mit 2%iger HCl.

Wir konnten die Glykoside A und D chromatographisch als dem A p i g e n i n zugehörig einordnen, B und C wurden durch die Hydrolyse nicht verändert. B war identisch mit A p i g e n i n , C mit L u t e o l i n . Das Aglykon des Glykosids F wurde papierchromatographisch als L u t e o l i n identifiziert. Bei den Glykosiden E und G konnten wir auf Grund der sehr geringen Konzentration keine sicheren Aussagen machen.

Die Messungen der UV-Maxima der aus dem Papier eluierten Glykoside und Aglykone führten zu keinen Ergebnissen. Entweder traten überhaupt keine Maxima auf oder nur sehr schwache. Diesen Umstand führten wir auf noch zu starke Verunreinigungen zurück. Um diese einzuschränken und um ein eventuell vorhandenes Quercetin²⁰⁾ nachzuweisen, arbeiteten wir nun nur mit Blütenblättern.

20) I. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. W. J. KIRMAYER, "Die Naturwissenschaften" 10,307 (1957)

2. Chromatographische Feststellung von drei Aglykonen

Wir trennten die Blütenblätter der Löwenzahnblüten von Pappus, Samen, Blütenboden und Kelchblättern. Aus den B l ü t e n b l ä t t e r n a l l e i n bereiteten wir einen wässerigen Extrakt, schüttelten mit Äthylazetat aus, destillierten dieses ab, nahmen in Methanol auf und reinigten durch eine P e r l o n s ä u l e . Die eingeeengte Lösung unterwarfen wir einer Salzsäurehydrolyse. Chromatographisch konnten wir nun neben L u t e o l i n und A p i g e n i n auch das in sehr geringer Konzentration vorliegende Q u e r c e t i n nachweisen.

Nach diesen Vorbereitungen führten auch die UV-absorptionsspektrophotometrischen Untersuchungen zu guten Ergebnissen. Die UV-Maxima und deren bathochrome Verschiebung mit Natriumazetat wiesen auf L u t e o l i n und A p i g e n i n h i n ²¹⁾:

	in Äthanol		in Äthanol + Na-azetat		Verschiebung	
	Max ₁	Max ₂	Max ₁	Max ₂	Max ₁	Max ₂
Luteolin	351 mμ	256 mμ	384 mμ	264 mμ	+33	+8
Apigenin	338 mμ	271 mμ	383 mμ	280 mμ	+45	+9

3. Isolierung von Luteolin aus Flores Taraxaci

Wir versuchten nun die Aglykone der Taraxacum-Glykoside zu isolieren. Nach Herstellung eines wässerigen Extraktes wurde mit wassergesättigtem Äthylazetat ausgeschüttelt, abdestilliert und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen. Wir hydrolysierten mit 2%iger HCl und stellten anschließend papierchromatographisch die Vollständigkeit der Hydrolyse fest. Die neutralisierte, ausgeschüttelte und eingeeengte Aglykonlösung wurde auf eine vorher sorgfältig gewaschene P o l y a m i d - S ä u l e (K 228/EM 2, BASF, Ludwigshafen) aufgetragen. Nachdem wir

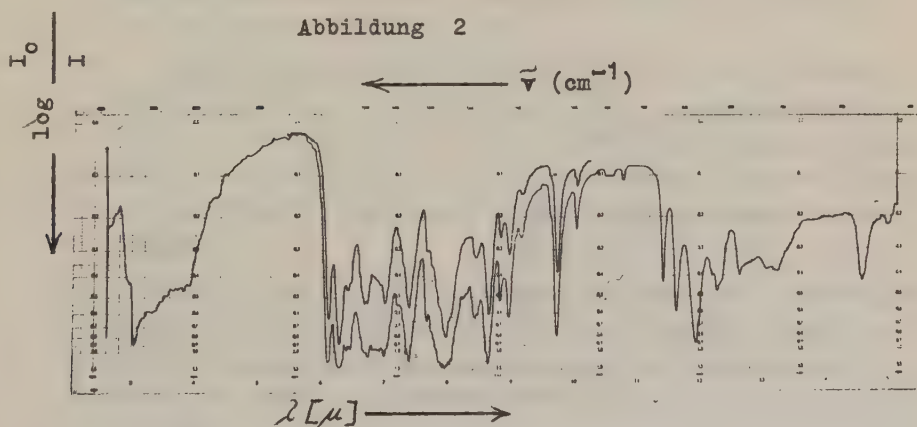
21) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER, H.NIESCHLAG u. G.WILDI, Arch.Pharmaz. Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 380 (1959)

2 l Wasser zur Säureentfernung langsam durch die Säule gegeben hatten, eluierten wir mit Methanol und fraktionierten zu 10 x 50 ml. Die Fraktionen drei und vier enthielten reines Luteolin, wie aus den Papierchromatogrammen ersichtlich war. Die übrigen unreinen Fraktionen wurden jeweils wieder auf eine neue Säule gegeben. Wir sammelten die reinen Fraktionen, engten auf 30 ml ein, versetzten die Lösung mit 10 ml Wasser und stellten zur Kristallisation in den Eisschrank.

Auf diese Weise gewannen wir ca. 100 mg L u t e o - l i n ($C_{15}H_{10}O_6$). Die Isolierung der beiden anderen Aglykone war uns auf Grund der zu geringen Konzentration nicht möglich.

a) Identifizierung des Aglykons als Luteolin

Das Aglykon hatte einen Schmelzpunkt von $328 - 330^{\circ}\text{C}$, das Azetylprodukt von $223 - 225^{\circ}\text{C}$ ²²⁾. Auch die CH-Bestimmung paßte zu dem für Luteolin berechneten Wert, ebenfalls die chromatographischen Vergleiche mit einer Testsubstanz, die UV-Maxima 350 und 255 m μ und das IR-Spektrum (in KBr).



b) Identifizierung der Zuckerkomponente

Nach Neutralisation der sauren, ausgeschüttelten Hy-

22) G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", II, Bd. III, S.863, Wien 1932

drolyselösung, konnten wir papierchromatographisch in Pyridin-Äthylazetat-Wasser (1:2:2) die Identität des Zuckers mit D-Glucose feststellen. Durch den Schmelzpunkt des Glucoseosazons bei $202 - 203^{\circ}\text{C}$ wurde der Befund erhärtet.

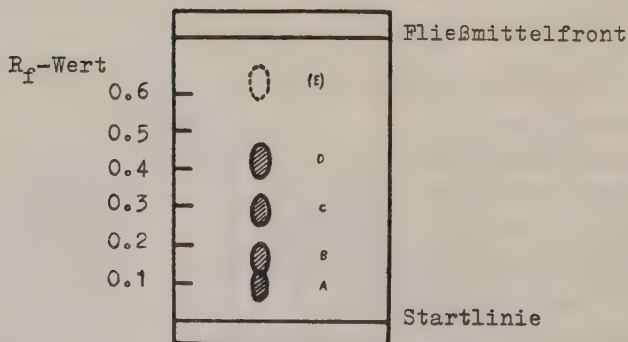
Da es sich um eine Hydrolyse der Gesamtglykoside aus Flores Taraxaci gehandelt hatte, ist somit festgestellt, daß als Zuckerkomponente aller Taraxacum-Glykoside nur G l u c o s e vorhanden ist.

Freie Glucose konnte ebenfalls in der Blütendroge nachgewiesen werden.

III. Isolierung von Luteolin-7-glucosid aus Flores Tanacetii

Wir stellten in ähnlicher Weise wie bei der Isolierung von Luteolin aus Flores Taraxaci einen wässrigen Extrakt aus 2.5 kg Flores Tanacetii her. Das Chromatogramm in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) zeigte folgende Flavonverteilung:

Abbildung 3



Die R_F -Werte und Fluoreszenzfarben (unbesprüht und besprüht) im UV-Licht waren:

Substanz	BEW	unbesprüht	mit Aluminiumsulfat	mit basischem Bleiazetat
B	0.08	schwach-orange	orange	braungelb
A	0.16	erdbraun	erdbraun	violett-purpur
C	0.29	gelb	gelbgrün	orange
D	0.40	rotbraun	gelb	ocker
E	0.58	schwach-gelb	gelbgrün	gelb

Dabei deuteten Fluoreszenzfarben und R_F -Werte bei Glykosid A auf Gossypitrin hin, bei C auf Quercimeritrin und bei D auf Luteolin-7-glucosid. Im Gegensatz zu W.J. KIRMAYER²³⁾ stellten wir für das Glykosid B einen niedrigeren R_F -Wert und andere Fluoreszenzfarben fest. Dieser Umstand könnte aber durch andere Flavonkonzentrationen bedingt sein.

1. Ausschüttelung mit organischen Lösungsmitteln und Herstellung von Mischkristallisat

Der klar filtrierte, wässrige Extrakt wurde zunächst zur Abtrennung von Fettstoffen, Harzen und Chlorophyllresten mit Petroläther, anschließend mit wassergesättigtem Äthylazetat ausgeschüttelt. Dieses wurde mit Wasser zurückgeschüttelt, mit getrocknetem Natriumsulfat versetzt und abfiltriert.

Die eingeengte Äthylazetatausschüttelung wurde nun zur Mischkristallisatbildung 72 Stunden in den Bisschrank gestellt. Das ausgefallene, gelbbraune Mischkristallisat (ca. 4 g) wurde abgenutscht und in wasserfreiem Azeton aufgenommen.

23) W.J. KIRMAYER, Dissertation, München (1959)

2. Reinigung des Mischkristallisates durch Magnesol-Säulen *)

Wir trugen das in wasserfreiem Azeton gelöste Mischkristallisat auf etwa 7 cm hohe Magnesol-Säulen²⁴⁾ auf, die nach S.H. WENDER und Mitarbeitern²⁵⁾²⁶⁾ mit wasserfreiem Azeton eingeschlämmt worden waren. Eluiert wurde mit wassergesättigtem Äthylazetat. Es ließ sich so eine gute Vorreinigung, wenn auch keine Trennung erzielen. Die Elutionskraft von wassergesättigtem Äthylazetat genügte, um die Glykoside wieder aus der Säule herauszubekommen. Die Begleitstoffe mit höherer Affinität zum Adsorptionsmittel verblieben dagegen in der Säule.

3. Trennung an Polyamid-Säulen

Als Säulenfüllung gelangte Ultramid-Pulver (K 228/BM 2, BASF, Ludwigshafen) zur Anwendung. Wir ließen es erst in Wasser quellen und wuschen mit Wasser, heißem 80%igen Methanol und wieder mit Wasser aus. Nach dieser Vorbereitung trugen wir den methanolischen Glykosidextrakt vorsichtig und in kleinen Mengen auf die Säule auf und entfernten mit Wasser einen Großteil der unter dem UV-Licht blau fluoreszierenden Stoffe. Darauf wurde die Säule mit einer 5%igen methanolischen Lösung beschickt, der Methanolgehalt fortlaufend um 5% gesteigert. 75-80%iges Methanol bewirkte eine Wanderung der Glykoside. Dabei wurden drei Zonen sichtbar. Die aus der Säule langsam austropfende Glykosidlösung wurde dann bei UV-Licht fraktioniert. Die zehn Fraktionen zu je 100 ml zeigten auf dem Chromatogramm folgendes Bild:

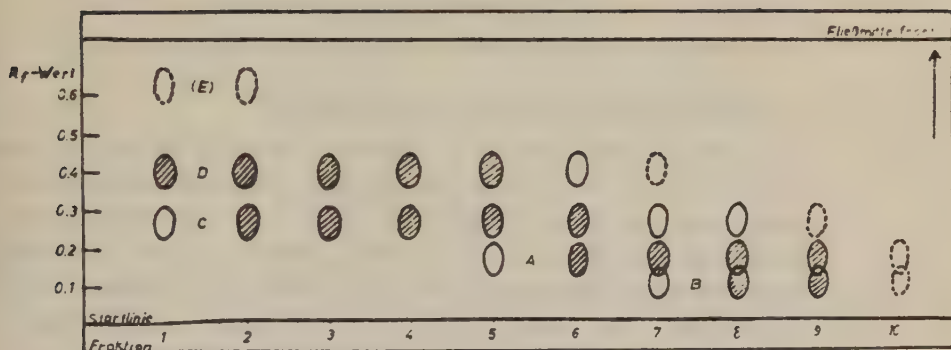
*) Magnesol = Magnesiumtrisilikat der Fa. Food a.Chem.Corp., New York

24) L.STICH, Dissertation, München (1958)

25) S.H.WENDER u. C.H.ICE, Analytic.Chem. 24, 1616 (1952)

26) S.H.WENDER, TH.B.GAGE, C.H.ICE u. Q.L.MORRIS, U.S.P. 2, 744, 893 (1956)

Abbildung 4



Je nach Glykosidinhalt wurden die einzelnen Fraktionen vereinigt und erneut auf eine Säule gegeben. Mit dieser Methode konnten ca. 100 mg Luteolin-7-glucosid aus 24 Fraktionen zu je 100 ml isoliert werden.

Bei den Glykosiden C, A und B versagte leider dieser Arbeitsgang. Luteolin-7-glucosid (D) und Quercimeritrin (C) verließen größtenteils gemeinsam die Säulen, dann folgten Gossypitrin (A) zusammen mit dem sich darunter befindenden Flavon (B). Dabei mußten noch vorhandene Spuren von den Glykosiden C und D als Lösungsvermittler fungieren.

Man konnte nämlich die Feststellung machen, daß die Glykoside A und B allein die Polyamidsäule so gut wie überhaupt nicht mehr verließen. Auch anschließende Versuche mit Zellosolesäulen^{*)} ließen uns zu dem gleichen Ergebnis kommen: Die Glykoside A und B, ja auch C blieben trotz Einsatzes verschiedenster Lösungsmittel an die Zellulose adsorbiert. Glykosid E war von vorneherein nur in Spuren festzustellen, so daß an eine etwaige Isolierung

*) Ederol Nr. 221, Fa. J.C.Binzer, Hatzfeld/Eder

rung oder sonstige Aufklärung nicht zu denken war. Geringe Mengen von Glykosid A, die aus unreinen Lösungen ausfielen, waren derart mit Perlon verunreinigt, daß sie zur Identifizierung nicht herangezogen werden konnten.

4. Konstitutionsermittlung von Glykosid D

Die Substanz hatte in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) einen R_F -Wert von 0.40, von 0.36 in Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) und von 0.44 in Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5). Der Flavoncharakter wurde durch den Zink-Salzsäure-Test nach R. WILLSTÄTTER und H. MALLISON²⁷⁾ bestätigt. Die Substanz fluoreszierte unter dem UV-Licht rotbraun, besprüht mit basischer Bleiazetatlösung ocker und mit Aluminiumsulfatlösung gelb. Diese Farberscheinungen sprechen für freie Hydroxygruppen in C-5-, C-3'- und C-4'-Stellung. Die freie C-5-OH Gruppe wurde auch durch die grüne Farbe bei der Ferrichloridreaktion (nach T.R. SESHADRI und Mitarbeitern²⁸⁾) angezeigt.

Eine Substitution an C-3 schied aus, da in Übereinstimmung mit dem Zirkon-Zitronensäure-Test²⁹⁾ und nachfolgender Säurehydrolyse auf dem Papier das Glykosid an C-3 nicht oxydiert war.

Die aus verdünntem Äthanol auskristallisierte Substanz schmolz bei 255-257°C. Die gefundenen CH-Werte stimmten mit einem berechneten von L u t e o l i n - m o n o g l u c o s i d ($C_{21}H_{20}O_{11}$) überein.

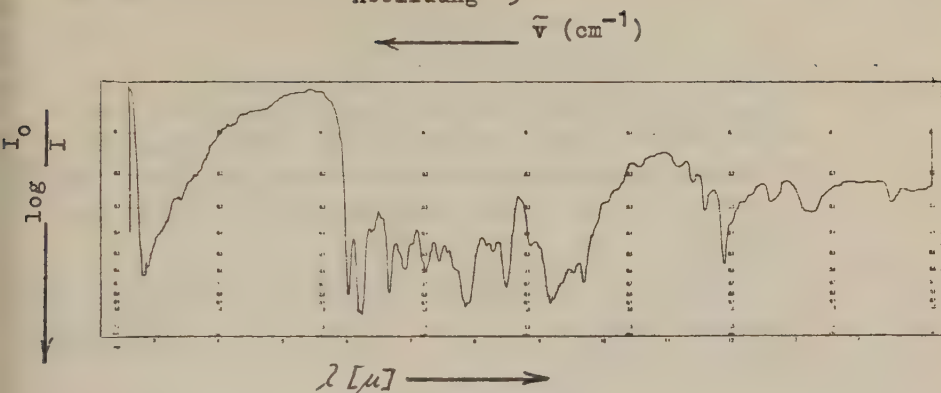
Die UV-Maxima und das IR-Spektrum deuteten auf ein L u t e o l i n - 7 - g l u c o s i d hin: Für eine o-Di-hydroxy-Stellung im Seitenphenyl sprachen die Schwingungen bei 840 und 755 cm^{-1} . Die C-O Valenzschwingungen des Zuckers zeigten sich zwischen 1100 und 1000 cm^{-1} , die für Flavonoide typische C=O Bande bei 1660 cm^{-1} .

27) R.WILLSTÄTTER u. H.MALLISON, S.B.preuß.Akad.Wiss.physik.-math. Kl. 769 (1914)

28) ref.: L.H.BRIGGS u. R.H.LOCKER, J.chem.Soc. 3131, London 1951

29) L.HÖRHAMMER u. K.H.MÜLLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 287/59, 310 (1954)

Abbildung 5



Das Aglykon stimmte papierchromatographisch, im Schmelzpunkt ($324 - 326^\circ\text{C}$), im Azetatschmelzpunkt ($224 - 227^\circ\text{C}$, Kofler) und im UV-Spektrum mit *Luteolin* überein. Die quantitative Hydrolyse ergab ein Monosid (61,85% Aglykon).

Papierchromatographisch (Pyridin-Äthylazetat-Wasser, 1:2:2) stimmte die Zuckerkomponente mit *D-Glucose* überein. Der Schmelzpunkt des Glucoseosazons betrug 207°C .

5. Klärung der Zuckerstellung in C-7 Position

C-7-Glykoside zeigen die gleichen UV-Absorptionsmaxima wie ihre Aglykone. Diese Feststellung wurde von einigen Autoren gemacht³⁰⁾³¹⁾³²⁾³³⁾. Da die UV-Maxima des von uns isolierten Glykosides und seines Aglykons im gleichen Wellenbereich lagen, ist ein Beweis für eine C-7-Verglykosidierung erbracht.

30) T.TASAKI, J.chem.Soc. Japan 47, 299 (1926)

31) S.HATTORI, Acta phytochim. (Tokyo) 4, 63 (1928)

32) L.MARCHLEWSKI u. B.SKARZYNSKI, Biochem.Z. 297, 56 (1938)

33) T.A.GEISSMAN in Peach: Tracey "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956, Bd. III

Auch die nach R. NEU³⁴⁾³⁵⁾ benützte Reaktion mit Di-o-Anisidin bewies die C-7-Stellung des Zuckers: Es traten keinerlei Färbungen auf.

Für eine ortho-Stellung freier Hydroxylgruppen im Seitenphenyl sprach die bathochrome Verschiebung der UV-Maxima im Borsäure-Natriumazetat-Milieu nach L.JURD³⁶⁾ und die Ockerfarbe der Bleiverbindungen³⁷⁾ unter dem UV-Licht.

Somit war die Identität der von uns isolierten Substanz mit L u t e o l i n - 7 - g l u c o s i d bewiesen.

6. Hydrolyse der Gesamtglykoside von Flores Tanaceti

Nachdem trotz großen Drogeneinsatzes nur die wandfreie Isolierung von Luteolin-7-glucosid gelungen war, versuchten wir nun die Aglykone der Tanacetum-Glykoside kristallin zu bekommen. Dabei mußten wir folgende Feststellung machen: "Gossypitrin" und das darunter liegende "Glykosid" ließen sich nicht hydrolysieren. Die "Glykoside" waren nach Behandlung mit 2 und 4%iger Salzsäure, 3 und 5%iger Schwefelsäure (2 Stunden) und nach einstündiger Kiliani-Hydrolyse³⁸⁾ unverändert. Nach zehnstündiger Hydrolyse mit 6%iger Schwefelsäure war dann weder ein Glykosid noch ein Aglykon aufzufinden.

L u t e o l i n wurde aus der Hydrolyse der Gesamtglykoside durch Säulenchromatographie isoliert, während das in relativ geringer Menge vorhandene "Quercetin" zum größten Teil in den Säulen verblieb.

Die Identifizierung des L u t e o l i n s wurde in der schon vorher beschriebenen Weise durchgeführt. Auch das IR-Spektrum sprach für Luteolin (siehe Seite 17).

34) R.NEU, Z.analyt.Chem. 151, 321 (1956)

35) R.NEU, Mikrochim.Acta 196 (1957)

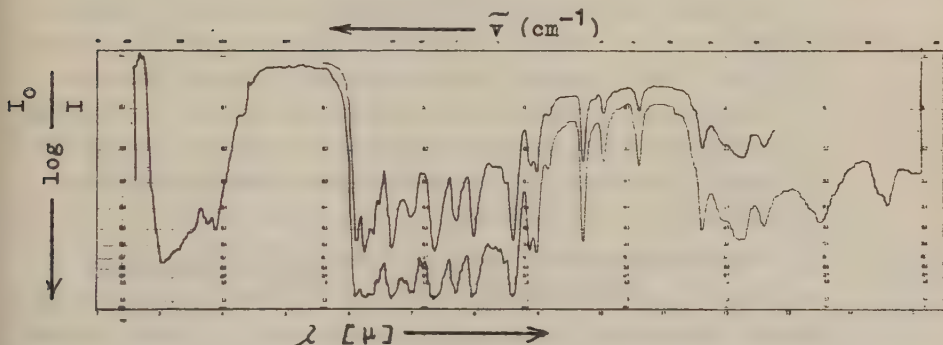
36) L.JURD, Arch.Biochem.Biophysics 63, 376 (1956)

37) W.J.KIRMAYER, Dissertation, München (1959)

38) H.KILIANI, Ber.dtsch.chem.Ges. 63, 2866 (1936)

Das IR-Spektrum des isolierten Luteolins zeigte charakteristische Valenzschwingungen bei $685 - 860 \text{ cm}^{-1}$, die auf eine o-Di-hydroxy-Stellung im Seitenphenyl zurückzuführen sind. Auch die typische C=O Bande der Flavonoidide bei 1660 cm^{-1} war deutlich zu erkennen:

Abbildung 6



Als Zucker konnte in der wässrigen, neutralisierten und ausgeschüttelten Hydrolyseflüssigkeit der Gesamtglykoside wiederum nur *G l u c o s e* festgestellt werden. Der Nachweis wurde papierchromatographisch und über den Schmelzpunkt des Glucoseosazons geführt.

IV. Über meso-Inosit aus Taraxacum officinale Web.

Nachdem sich zwar Angaben in der Literatur über das Vorkommen von Inosit in der Droge finden, aber weder gesichert ist, in welchem Teilen der Droge, noch in welcher Konzentration es vorkommt, wurde im Folgenden versucht, den Inosit aus den einzelnen Pflanzenteilen zu isolieren und strukturell eindeutig festzulegen.

1. Isolierung von meso-Inosit aus Flores Taraxaci

Zunächst wurde aus 1 kg getrockneten Blüten, die auch für die Isolierung der Flavone Ausgangsmaterial waren, ein wässriger Extrakt hergestellt und nach der von

G. KLEIN³⁹⁾ angegebenen Bleifällungsmethode aufgearbeitet.

Zunächst fällten wir den auf etwa 1 l eingeeengten wässerigen Extrakt zur Reinigung mit einer gesättigten Lösung von Plumbum aceticum DAB 6. Der abfiltrierte Niederschlag wurde verworfen und aus dem Filtrat erneut mit Bleiessig und Ammoniak gefällt. Das voluminöse Produkt, das hauptsächlich aus Bleikomplexen der Pflanzensäuren, Flavone und des Inosits bestand, wurde nun mit stark verdünntem Äthanol angeschlämmt und einer Schwefelwasserstoff-Fällung unterzogen. Durch das nun bleifreie Filtrat leiteten wir CO₂, engten stark ein, versetzten mit einem Überschuß von Methanol und etwas Äther und verbrachten die Lösung in den Eisschrank.

Der entstandene, kristalline Niederschlag wurde mehrmals aus verdünntem Methanol mit Äther- und Eisessigzusatz umkristallisiert und lieferte ca. 1 g einer weißen, süßlich schmeckenden Substanz. Die angegebene Menge ist keine absolute Inhaltsangabe, sondern ein auf die Bleimethode bezogener Relativwert.

2. Identifizierung der isolierten Substanz als meso-Inosit

Die in weißen, feinen Nadeln büschelartig kristallisierende Substanz löste sich in 7.5 Teilen Wasser, etwas schwerer in verdünntem Alkohol und war praktisch unlöslich in reinem Alkohol und Äther. Die Substanz hatte einen scharfen Schmelzpunkt von 222 - 225°C und verlor beim Trocknen in der Trockenpistole nahezu nichts an Gewicht. Durch Chromatographie in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) lieferte die Substanz einen Flecken vom R_f-Wert 0.066 und reduzierte ammoniakalische Silbernitratlösung nach Entwicklung über dem Dampftopf zu metallischem Silber.

Einen weiteren Hinweis, daß es sich hierbei um ein Inosit handelte, brachten die positiven Reaktionen nach

39) G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse" II, Bd. I, S. 240 (1932)

J.v. SCHERER⁴⁰⁾, M. GALLOIS⁴¹⁾ und F. FISCHER und F.H. KÜRTE⁴²⁾.

Zur näheren Identifizierung wurde eine C-H-Bestimmung durchgeführt, die ohne Fehler mit den für $C_6H_{12}O_6$ berechneten Werten übereinstimmte. Da die Substanz in wässriger Lösung keinerlei optische Aktivität erkennen ließ, schieden die optisch aktiven Isomere aus. Die Vermutung, daß es sich bei der isolierten Substanz um meso-Inosit handeln könnte, wurde durch einen IR-spektroskopischen Vergleich zwischen unserer Substanz und einem Test-meso-Inosit (Merck) bestätigt. Die absolute Übereinstimmung beider Verbindungen läßt dies deutlich erkennen:

Meso-Inosit:

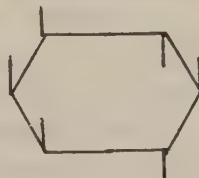
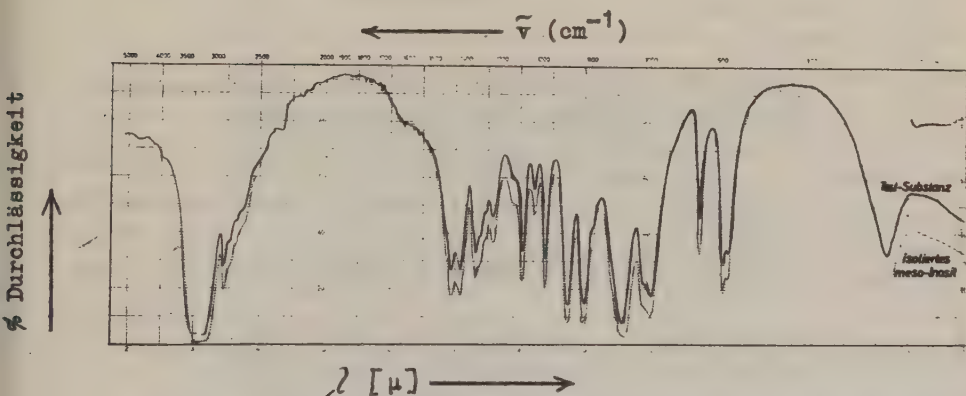


Abbildung 7



Wir haben zusätzlich von der isolierten Verbindung durch Azetylierung mit Essigsäureanhydrid ein Derivat hergestellt, das bei 215 - 217°C schmolz. Während die

40) J.v.SCHERER, Liebig's Ann. 81, 375 (1855)

41) M.GALLOIS, Z.analyt.Chem. 4, 264 (1865)

42) F.FISCHER u. F.H.KÜRTE, Biochem.Z. 254, 138 (1932)

C-H-Werte des Azetylproduktes gut auf ein Hexaazetat paßten, ergab die Azetylgruppenbestimmung in mehreren Versuchen nur jeweils ca. 90% der Theorie, was eher einem Pentaazetat entsprechen würde. Da in der Literatur für ein meso-Inosit-Hexaazetat jedoch ein Schmelzpunkt von $215 - 216^{\circ}\text{C}$ angegeben wird und außerdem die gefundenen C-H-Werte mit den für das Hexaazetat berechneten gut übereinstimmen, dürfte die bei der Azetylgruppenbestimmung auftretende Differenz auf Schwierigkeiten bei der Verseifung zurückzuführen sein.

Damit steht eindeutig fest, daß es sich bei dem in *Taraxacum officinale* beschriebenen Inosit um ein meso-Inosit gehandelt hat. Bemerkenswert ist der relativ hohe Inosit-Gehalt von ca. 0.1% in den Blüten.

Die prozentualen Angaben von meso-Inosit stellen keine absoluten Werte dar. Sie sind relativ und beziehen sich auf die von uns angewandte Bleifällungsmethode.

3. Weitere Untersuchungen der einzelnen Drogenteile von *Taraxacum officinale* Web. auf meso-Inosit

Nach dem schon beschriebenen Verfahren isolierten wir m e s o - I n o s i t noch aus folgenden Teilen der Droge:

1. Aus den Blütenblättern in einer Konzentration von 0.05%,
2. aus Pappus + unreifen Samen von 0.12%,
3. aus den Blütenstengeln von 0.03% und
4. aus dem Kraut in einer Konzentration von 0.01%.

In *Radix Taraxaci* konnte meso-Inosit ebenso wie in *Flores Tanaceti* nur papierchromatographisch nachgewiesen werden.

Der Inosit-Gehalt von *Taraxacum officinale* dürfte an wachstums- und jahreszeitlich bedingte Veränderungen gebunden sein und erheblichen Schwankungen unterliegen.

So konnten wir bei einer vor der Blüte gesammelten Droge einen Inosit-Gehalt von 0.2% feststellen.

Die %-Angaben beziehen sich alle auf das Trockengewicht der einzelnen Drogenteile und auf freien meso-Inosit. Ob und wie weit Inosit in gebundener Form als Phytin (Kalzium-Magnesiumsalz des Inosit-hexaphosphorsäureesters) vorliegt, wurde nicht festgestellt.

Bei frischen Löwenzahnblüten erhielten wir einen meso-Inosit-Wert von 0.02%.

Nach unseren Ermittlungen ist für die Inosit-Ausbeuten eine methanolische Extraktion im Soxhletapparat günstiger als eine Mazeration mit heißem Wasser.

Bei den Versuchen aus Flores Tanacetii ebenfalls meso-Inosit zu isolieren, erhielten wir bei einem Einsatz von 100 g Droge 750 mg KNO_3 . Da nämlich nach den Bleifällungen und den darauf folgenden schon erwähnten Behandlungen keine Auskristallisation von meso-Inosit erfolgte, führten wir diesen Umstand auf eine noch zu starke Verunreinigung mit organischen Substanzen zurück. Wir kochten nun mit konz. Salpetersäure (G. KLEIN⁴³) kurz auf und versetzten die erkaltete Lösung mit Methanol. Den kristallinen Niederschlag identifizierten wir als Kaliumnitrat. Da diese Methode keinen absoluten Kalium-Wert geliefert haben dürfte, ist der relativ hohe Gehalt von ca. 0.3% Kalium um so bemerkenswerter.

4. Vorkommen von meso-Inosit und seine physiologische und therapeutische Bedeutung

Meso-Inosit, ein Hexahydroxyderivat des Cyclohexans, wurde im Jahre 1850 von J.v. SCHERER⁴⁴) bei der Isolierung des Muskelkreatins entdeckt. Er verlieh ihm auch seinen Namen Inosit (von dem griechischen Wort *ἰσός, ἰνός* = der Muskel). Der Name wurde dann später

43) G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse" II, Bd.I, S.240 (1932)

44) J.v.SCHERER, Liebig's Ann. 73, 322 (1850)

auf eine ganze Reihe von Hexahydroxy-hexahydrobenzolen übertragen. H. VOHL⁴⁵⁾ konnte als erster meso-Inosit in Pflanzen nachweisen. In der Zwischenzeit hat man in vielen Pflanzen und in fast allen tierischen Organen und Geweben meso-Inosit gefunden. Während im Pflanzenreich der meso-Inosit sowohl frei, als auch als Mono-, Di-, Tri- und Hexaphosphorsäureester, sowie als Methyläther und komplex an Eiweißstoffe und Lipotide gebunden vorkommt, liegt er im tierischen Organismus fast ausschließlich in freier Form vor.

1901 untersuchte E. WILDIERS⁴⁶⁾ eine "unbekannte Substanz", die für Wachstum und Leben der Hefe notwendig war und benannte sie Bios (I). E.V. EASTCOTT⁴⁷⁾ konnte 1928 die Identität von Bios I und meso-Inosit nachweisen.

Doch erst seit 1940 drängte sich dieses Cyclit mehr und mehr in den Vordergrund. Ausschlaggebend dürften hierfür die Arbeiten D.W. WOOLLEY'S⁴⁸⁾ gewesen sein. Er wies in Tierversuchen an Ratten und Mäusen, später auch an Hunden, Affen, Geflügel usw. nach, daß ein Fehlen von meso-Inosit in der Nahrung zu Wachstumsstörungen, Dermatitis und Alopezie führte.

1942 wurde die Strukturformel des meso-Inosits von T. POSTERNAK⁴⁹⁾, G. DANGSCHAT und H.O.L. FISCHER⁵⁰⁾ festgelegt.

Nun wurde meso-Inosit, gestützt auf analytische Befunde von R.J. WILLIAMS, F. SCHLENK u. M.A. EPPRIGHT⁵¹⁾

45) H. VOHL, Annalen 99, 125 (1856)

46) E. WILDIERS, La Cellule 18, 313 (1901)

47) E.V. EASTCOTT, J. physiol. Chem. 32, 1094 (1928)

48) D.W. WOOLLEY, J. Biol. Chem. 136, 113 (1940), 139, 29 (1941),
140, 453 (1941), 147, 581 (1943),
Science 92, 384 (1940)
J. Nutrition 21, (1941)
J. Exp. Med. 75, 277 (1942)

49) T. POSTERNAK, Helv. Chim. Acta 25, 746 (1942)

50) G. DANGSCHAT u. H.O.L. FISCHER, Naturwissenschaften 30, 146 (1942)

51) R.J. WILLIAMS, F. SCHLENK u. M.A. EPPRIGHT, J. Amer. Chem. Soc. 66,
896 (1944)

in die Gruppe der B-Vitamine eingeordnet. Nach weiteren Tierversuchen begann man meso-Inosit therapeutisch in der Humanmedizin zu verwenden.

Der erste klinische Bericht stammt 1945 von A.T. MILHORAT und W.E. BARTELS⁵²⁾, die feststellten, daß Tocopherol ohne die aktivierende Wirkung von meso-Inosit im Magen-Darmtrakt bei Dystrophia musculorum progressiva (ERB) wirkungslos blieb.

Wie weit die Erkenntnisse aus den Tierversuchen mit meso-Inosit sich auch auf den Menschen übertragen lassen, kann man noch nicht genau überblicken. Es läßt sich jedoch mit Bestimmtheit behaupten, daß meso-Inosit auch im menschlichen Organismus Aufgaben zu erfüllen hat, die man nur bis heute noch nicht in all ihrer Vielfalt und ihren Einzelheiten erkannt hat. In therapeutischer Hinsicht bestehen folgende Anwendungsmöglichkeiten:

1. In der Kinderheilkunde. Der meso-Inosit ist bedeutungsvoll für den Phosphorsäurestoffwechsel und das Wachstum des Säuglings.
2. Als Antialopeziefaktor in Verbindung mit p-Aminobenzoessäure.
3. Beim Fettstoffwechsel.

Meso-Inosit ist lipotrop wirksam in Verbindung mit Cholin. Es ist teilweise am Abtransport von in der Leber eingelagerten Neutralfetten beteiligt. Man darf ihm eine Wirkung bei Leberparenchymerkrankungen zusprechen, wenn diese mit Verfettung gekoppelt sind. Ferner dürfte der meso-Inosit in enger Beziehung zum Cholesterinstoffwechsel stehen und pathologische Cholesterinspiegel senken.

Meso-Inosit findet auch Anwendung bei primären Myopathien, Morbus Erb in Verbindung mit Vitamin E, Coronaritis und Coronarthrombose, Xanthomatose, Lipämie, atonischen Obstipationen und beim Blasen-Carcinom.

52) A.T.NILHORAT u. W.E.BARTELS, Science 101, 93 (1945)

Meso-Inosit ist somit ein Stoff, der auch in Zukunft viel Aufmerksamkeit verdient.

5. Einwirkung von meso-Inosit auf Wachstum und Metamorphose der Kaulquappen

Da uns keine Literaturangaben über Inositwirksamkeit gegenüber Kaulquappen bekannt waren, interessierten wir uns für etwaige Wachstums- und Metamorphose-Einwirkungen dieses Stoffes auf die Lurche.

Aus einem Laichballen von *Rana temporaria* *) stammend, wurden die Tiere bei einer Durchschnittslänge von 1.5 cm und einem Durchschnittsgewicht⁵³⁾ von 50 mg in den Versuch genommen, der sich über 36 Tage hinzog.

In vier 1 l Weckgläser wurden je 20 Kaulquappen gegeben. Wir benutzten nur Teichwasser aus dem Botanischen Garten **), das täglich gewechselt wurde. Das Futter bestand aus 100 mg Vitawil-Fischfutter täglich pro Glas. Glas I wurde täglich 10 mg, Glas II 100 mg und Glas III 1000 mg meso-Inosit zugesetzt. Glas IV diente als Blindversuch.

Bei gleichen Anfangsbedingungen konnten wir bereits nach 15 Tagen deutliche Gewichts- und Längenunterschiede feststellen:

Gesamtgewicht der Tiere		Durchschnittslänge
Glas I	5.427 g	28 mm
Glas II	5.761 g	29 mm
Glas III	6.319 g	31 mm
Glas IV	5.473 g	28 mm

53) B.ROMEIS, Endokrinologie 18, 10 (1937)

*) Fundort: Grünwald, Isartal, 17.4.1960

**) Botanischer Garten München, Menzingerstraße

Während also die Gabe von 10 mg/ l vorerst keinen Erfolg zeigte, war zwischen den Tieren des Blindversuchs (IV) und den Tieren, die 1 g meso-Inosit/l (III) erhielten, eine Gewichts- und Längendifferenz von 42 mg/Tier zu verzeichnen und ein Längenunterschied von 3 mm, zwischen IV und II 14 mm und 1 mm.

Bei Beginn der Metamorphose nahmen die Tiere etwas an Gewicht ab, der prozentuale Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen blieb jedoch erhalten.

Nach 22 Tagen waren die Metamorphose-Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen klar zu erkennen:

gegliederte Hinterbeine	
Glas I	10%
Glas II	20%
Glas III	50%
Glas IV	10%

Nach 30 Tagen ergab sich folgendes Bild:

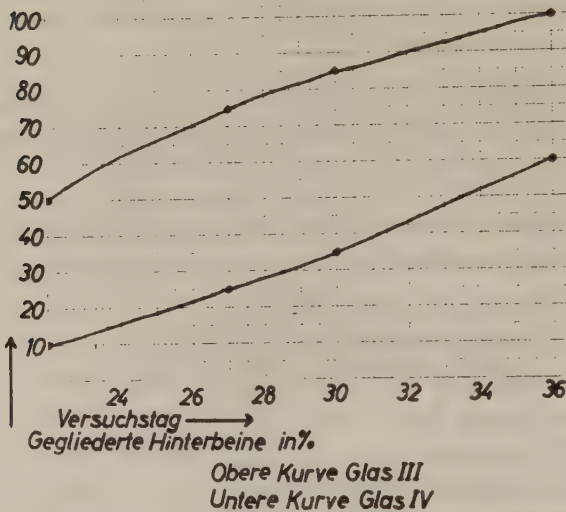
gegliederte Hinterbeine		Vorderbeine
Glas I	50%	10%
Glas II	55%	15%
Glas III	85%	50%
Glas IV	35%	5%

36. Tag des Versuches:

gegliederte Hinterbeine		Vorderbeine
Glas I	70%	45%
Glas II	85%	55%
Glas III	100%	75%
Glas IV	60%	40%

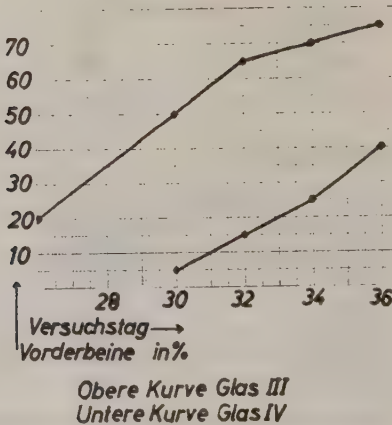
Bei Übertragung unserer Zahlenwerte in ein Koordinatensystem ergaben sich folgende anschauliche Kurven:

Abbildung 9



Vergleichende graphische Darstellungen zwischen den mit 1 g meso-Inosit/Tag behandelten Tieren (jeweils die oberen Kurven, Glas III) und den Blindversuchen (jeweils die unteren Kurven, Glas IV):

Abbildung 10



Vom 36. Versuchstag stammen die beiden Aufnahmen, die nochmals auf die erheblichen Größenunterschiede hinweisen sollen, die zwischen den Tieren des gleichen Entwicklungsstadiums von Glas III und IV zu verzeichnen waren.

Abbildung 11



36. Versuchstag. Kaulquappen aus Glas III.

Abbildung 12



36. Versuchstag. Kaulquappen aus Glas IV.

Meso-Inosit zeigte also selbst noch in einer Konzentration von 10 mg/l eine Einwirkung auf die Metamorphose der Kaulquappen. Nicht zu übersehen ist jedoch der Unterschied zwischen den Tieren, die 1 g meso-Inosit/l täglich erhielten und denen des Blindversuches. Die mit Inosit behandelten Tiere waren schwerer und länger und begannen auch früher mit der Metamorphose.

Der wachstumssteigernde Effekt des meso-Inosits gegenüber Kaulquappen und die damit zusammenhängende frühe Metamorphose ist hiermit erstmalig bewiesen.

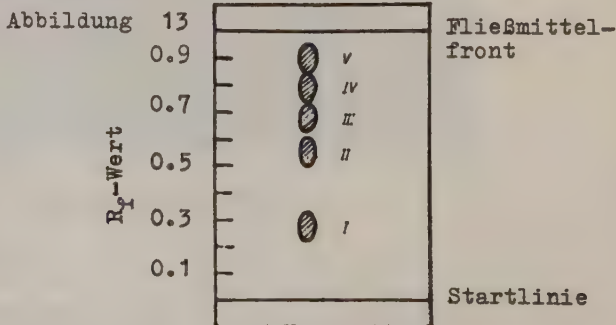
V. Untersuchungen über Pflanzensäuren aus Flores Taraxaci

1. Abtrennung der Säuren von den übrigen Stoffen

Auf dem Chromatogramm des wässerigen Extraktes waren wohl unter dem UV-Licht blau fluoreszierende Flecke festzustellen, andere Stoffe überlagerten sich jedoch mit ihnen.

Um die Säuren nun anzureichern, wandten wir die Bleimethode⁵⁴⁾ an. Nach Entfernung von Pb, H₂S, S und meso-Inosit brachten wir das eingeeengte Filtrat auf eine Perlonsäule, der eine Aluminiumoxydsäule vorgeschaltet war. An letzterer wurden die Flavonglykoside quantitativ adsorbiert. Wir eluierten zuerst mit Wasser, wobei vier Säuren (II, III, IV und V) die Säule verließen, dann mit Methanol, mit dem eine weitere Säure eluiert wurde.

Das übersichtlichste Chromatogramm ergibt sich mit 15%iger Essigsäure als Fließmittel:



54) A. BAERHEIM-SVENDSEN, "Zur Chemie norwegischer Umbelliferen", Oslo, S. 50 (1954)

I fluoreszierte unter dem UV-Licht schwach dunkelblau, II hellblau, III, IV und V blaßblau. Mit NH_3 -Dämpfen hellte sich die Farbe bei allen zu einem schwach-hellgrünen Ton auf.

Alle ergaben eine schwach-fleischfarbene Diazo-Reaktion. 2%ige Eisenschloridlösung führte bei II - V zu einer zarten Graufärbung, bei I zu einem rotbraunen Fleck. Mit Bromphenolblau zeigten die Säuren keine Reaktion. Ein Esternachweis (Hydroxamat-Test⁵⁵) verlief ebenfalls negativ. II - V reagierten auf die Molisch-Reaktion⁵⁶) positiv.

2. UV-absorptionsspektrophotometrische Messungen und Hydrolyse der Säuren

Da eine Isolierung trotz großen Drogeneinsatzes undurchführbar war, fertigten wir Streifenchromatogramme an, schnitten die einzelnen Säurezonen aus und eluierten sie mit Methanol. Bei den UV-Spektren, die wir mit diesen Lösungen machten, stellten wir fest, daß die Maxima bei 220 - 225 m μ alle durch das Papier hervorgerufen waren. Auch gewaschenes Chromatogrammpapier führte zu diesen "Papier-Maxima". Es war unmöglich, aus den nur teilweise und schwach auftretenden sonstigen Maxima Rückschlüsse zu ziehen.

Nach 1/2stündiger, 2%iger NaOH-Hydrolyse der fünf Säuren konnten wir nur mehr einen Fleck auf dem Chromatogramm feststellen, der den R_F -Wert 0.69 (15%ige Essigsäure als Laufmittel) hatte. Er zeigte mit NH_3 -Dämpfen nur eine undeutliche Veränderung seiner schwach-blauen Farbe, eine zart-fleischfarbene Diazo-Reaktion und eine hellbraune Farbe mit Eisenchloridlösung. Auch andere von uns angewandte Reagenzien zeigten nur uncharakteristische, nicht klar erkennbare Reaktionen. Wir konnten die Säure keiner uns bekannten Pflanzensäure mit Bestimmtheit zuordnen. Es könnte sich eventuell um Chlorogensäure handeln.

Wir möchten an dieser Stelle folgenden interessanten Hinweis geben: Beim Arbeiten mit Perlonsäulen ist es trotz vorhergegangener sorgfältiger Reinigung des Perlons möglich,

55) K. PEACH u. M. V. TRACEY, "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Bd. II, S. 437

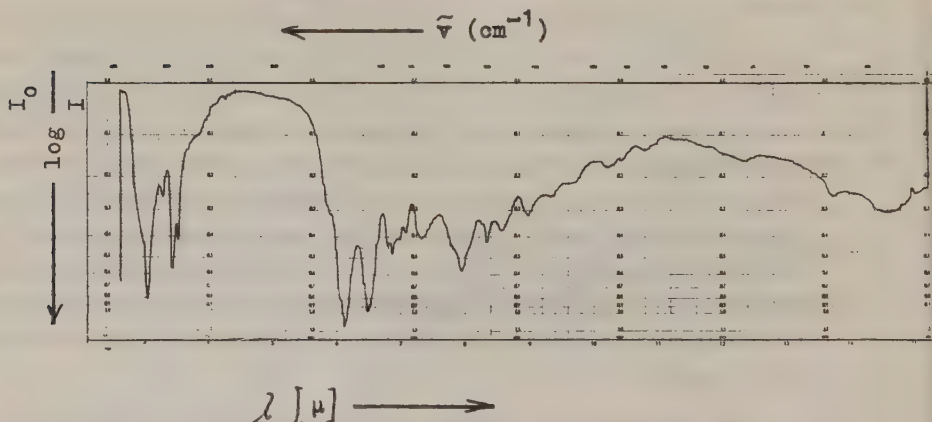
56) G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. I, S. 581 (1932)

daß sowohl mit Wasser als auch mit Methanol Perlon-Kettenbruchstücke mit herausgewaschen werden. Diese zeigen gleichfalls unter dem UV-Licht eine blaßblaue Fluoreszenz auf dem Chromatogramm. Wir fanden nun eine recht einfache Möglichkeit heraus, um zwischen Perlon und anderen blau fluoreszierenden Stoffen zu unterscheiden. Chromatographiert man die fragliche Lösung und läßt absteigend in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) laufen, so erhält man nach Besprühen mit modifiziertem Dragendorff-Reagens (nach R.MUNIER und M. MACHEBOEUF⁵⁷⁾) bei R_f 0.82 einen rötlichen, bei R_f 0.87 einen orangen Fleck. Ersterer stammt von Perlon-Kettenbruchstücken, die mit Wasser herausgewaschen wurden, letzterer von denen, die mit Methanol eluiert wurden. Dabei kann bei starker Perlonverunreinigung der aus der Säule austropfenden Lösungsmittel eine Schwanzbildung bis zu 10 cm auf dem Chromatogramm auftreten.

Auch das IR-Spektrum kann bei etwaigen Unklarheiten über isolierte "Säuren" von großem Nutzen sein.

IR-Spektrum von Perlon:

Abbildung 14



57) R.MUNIER u. M.MACHEBOEUF, Bull.Soc.chim.biol. 33, 846 (1951)

VI. Untersuchung des ätherischen Öles aus Flores Tanaceti mittels
Dünnschichtchromatographie

Während uns bei Flores Taraxaci mit dem Apparat nach Moritz keine Gewinnung ätherischen Öles gelang, war es bei Flores Tanaceti mit keiner Schwierigkeit verbunden.

Das frisch destillierte und mit Chloroform verdünnte ätherische Öl wurde in verschiedener Konzentration auf eine Kieselgel-Platte^{*)} aufgetragen. Als Fließmittel diente Chloroform. Nach Besprühen mit Antimonpentachloridlösung und fünf minütigem Trocknen bei 110°C waren auf der Platte deutlich sieben Punkte zu erkennen. Daraus läßt sich schließen, daß neben den fünf bereits bekannten Inhaltsstoffen zwei weitere (R_f 0.32 und 0.40) in dem ätherischen Öl des Rainfarns enthalten sind. Um welche Stoffe es sich dabei handelt, konnte nicht ermittelt werden.

VII. Prüfung auf Alkaloide in Chrysanthemum vulgare Bernh.
und Taraxacum officinale Web.

R. JARETZKY und F. KÜHNE⁵⁸⁾ konnten das von P. SIEDLER⁵⁹⁾ in Chrysanthemum vulgare beschriebene Alkaloid nicht nachweisen.

Es war uns ebenfalls unmöglich, weder beim Rainfarn noch beim Löwenzahn einen Alkaloidnachweis zu führen.

Bei diesen Versuchen wurden wässrige Extrakte mit Ammoniak versetzt und über eine Aluminiumoxyd-Perlon-Säule gegeben. Eluiert wurde mit Chloroform. In den eingeengten Eluatn hätten sich die freigewordenen Alkaloidbasen befinden müssen. Auf den Chromatogrammen zeigte sich jedoch im Gegensatz zu den mitgelauften Testsubstanzen mit modifiziertem Dragendorff-Reagens nach R. MUNIER und M. MACHEBOEUF⁶⁰⁾ keine Reaktion.

Cholin jedoch konnte nicht nur in der Taraxacum-Wurzel,

*) Kieselgel G der Fa. E. Merck, Darmstadt

58) R. JARETZKY u. F. KÜHNE, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 6, 353 (1933)

59) P. SIEDLER, Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 12, 64 (1902)

60) R. MUNIER u. M. MACHEBOEUF, Bull. Soc. chim. biol. 33, 846 (1951)

sondern auch im Kraut und in den Blüten von Löwenzahn papierchromatographisch nachgewiesen werden.

VIII. Prüfung auf östrogene Stoffe in *Taraxacum officinale* Web.

F. GRANDEL⁶¹⁾ berichtete über einen östrogenen Inhaltsstoff aus Flores Taraxaci, und zwar sprach er von 800 ME (= Mäuse-Einheiten) pro kg Trockendroge. Wir vergleichen die Petrolätherausschüttelungen aus den wässerigen Extrakten von 500 g Flores und 100 g Radix Taraxaci mit östrogenen Testsubstanzen auf dem Wege der Dünnschichtchromatographie.

Eine Kieselgelplatte wurde mit 50%iger Formamidlösung besprüht. Nach dem Trocknen erfolgte das Auftragen der Lösungen. Als Fließmittel diente Benzol-Chloroform (4:1). Anschließend besprühten wir mit einer Antimontrichloridlösung. Es konnte ebenso wie bei absteigenden Chromatogrammen in Chloroform-Benzol-Ammoniak (1:9:1) keine Übereinstimmung mit den Testsubstanzen (Östron und Östradiol) festgestellt werden.

Wir versetzten nun die eingeengten Petrolätherausschüttelungen mit wenig 1/n NaOH im Scheidetrichter, schüttelten und ließen die wässerigen Lösungen nach dem Absetzen ab. Diese versetzten wir bis zur schwach-sauren Reaktion mit 1/n HCl, wobei jeweils ein flockiger Niederschlag entstand. Bei Vorhandensein östrogenen Stoffe hätten sich diese in der eben erwähnten Fällung befinden müssen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und im Vakuum-Exsiccator getrocknet (11 mg aus 500 g Flores, 62 mg aus 100 g Radix).

Freundlicherweise führte Herr Dr. Hecker^{*)} (Max-Planck-Institut, München) für uns mit diesen Substanzen einen Allen-Doisy-Test durch. Unter anderem arbeitete er auch mit zehnmal so starken Lösungen als es normalerweise bei diesem Test üblich ist. Das Ergebnis war n e g a t i v .

Es scheinen sich also entgegen den Angaben F. GRANDEL'S⁶¹⁾ keine östrogenen-wirksamen Substanzen in den Löwenzahnblüten zu befinden, es sei denn, daß ihr Auftreten an ganz bestimmte Böden oder Entwicklungsstadien der Blüte gebunden wäre.

61) F. GRANDEL, Hippokrates 4, 115 (1960)

*) Wir danken Herrn Dr. Hecker für seine Bemühungen.

IX. Testung der Flavonglykoside und Aglykone von Taraxacum
officinale Web. und Chrysanthemum vulgare Bernh. auf
ihre spasmolytische Wirkung

Als Vorversuch wurden von der Firma Heumann^{*)} getestet:

- a) 50 ml wässriger Extrakt aus 30 g Flores Taraxaci
 - b) 50 ml wässriger, hydrolysierter Extrakt aus 100 g Flores Taraxaci
 - c) 50 ml wässrige Lösung (Äthylazetatausschüttelungen aus 100 ml wässrigem Extrakt von 50 g Flores Tanaceti, siehe Seite).
- a) bewirkte eine Senkung des Tonus und eine Hemmung des Bariumchloridkrampfes. b) und c) waren wirksam gegenüber Azetylcholin, Histamin und Bariumchlorid.

Im Folgenden sind die einzelnen Ergebnisse der am Meerschweinchendünndarm getesteten Lösungen aufgeführt:

a) Azetylcholin-Test

Gegenüber Azetylcholinkrämpfen zeigte die Lösung a) keine Hemmung, dagegen wurde die Spontanitätigkeit des Darmes bei allen Dosierungen aufgehoben.

Histamin-Test

Histaminkrämpfe wurden durch die Lösung a) ebenfalls nicht gehemmt, jedoch wurde auch hier die Spontanitätigkeit des Darmes mit der Lösung unterbunden.

Bariumchlorid-Test

25 ml/l Bad der Lösung a) hemmten 50 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 25%

50 ml/l Bad der Lösung a) hemmten 50 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 95%

b) Azetylcholin-Test

5 ml/l Bad der Lösung b) hemmten 10 γ AC/l Bad um ca. 25%

12.5 ml/l Bad der Lösung b) hemmten 10 γ AC/l Bad um ca. 95%

Histamin-Test

5 ml/l Bad der Lösung b) hemmten 25 γ Histamin/l Bad um ca. 25%

12.5 ml/l Bad der Lösung b) hemmten 25 γ Histamin/l Bad um ca. 95%

*) Wir danken der Fa.Heumann, Nürnberg, für die Durchführung der Teste.

Bariumchlorid-Test

2.5 ml/l Bad der Lösung b) hemmten 20 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 25%

5 ml/l Bad der Lösung b) hemmten 20 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 95%

c) Azetylcholin-Test

5 ml/l Bad der Lösung c) hemmten 7.5 γ AC/l Bad um ca. 25%

12.5 ml/l Bad der Lösung c) hemmten 7.5 γ AC/l Bad um ca. 60%

Histamin-Test

5 ml/l Bad der Lösung c) hemmten 20 γ Histamin/l Bad um ca. 50%

12.5 ml/l Bad der Lösung c) hemmten 20 γ Histamin/l Bad um ca. 95%

Bariumchlorid-Test

1.25 ml/l Bad der Lösung c) hemmten 20.8 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 10%

2.50 ml/l Bad der Lösung c) hemmten 20.8 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 50%

Bei allen Lösungen kann also von einer spasmolytischen Wirksamkeit gesprochen werden.

Im Gegensatz zur Firma Heumann, die für die Spasmolyse-Testungen Meerschweinchendünndärme verwendet hatte, benutzen wir zu den von uns im eigenen Laboratorium durchgeführten Spasmolysebestimmungen Kaninchendünndarmausschnitte. Neben den Vergleichsspasmolytica Papaverin bzw. Atropin verwendeten wir 50 ml wässerigen Extrakt (hydrolysiert) aus 50 g Flores Taraxaci, den wir zur Lösung im Verhältnis 4 + 2 bzw. 5 + 2 mit Propylenglykol versetzt hatten (auf den Abbildungen 15 und 16 mit L. (4 + 2 Pg) bzw. L. (5 + 2 Pg) bezeichnet). Außerdem wurde aus Taraxacum isoliertes Luteolin auf seine Spasmolyse-Wirkung getestet.

Zusammenfassend und vergleichend läßt sich folgendes sagen: 2 ml L. (4 + 2 Pg) zeigte gegenüber Bariumchloridkrämpfen etwa dieselbe Wirkung wie 300 γ Papaverin, 3 ml L. (5 + 2 Pg) wie 400 γ Papaverin. Der Effekt von 10 mg Luteolin in 2 ml Propylenglykol war bedeutend größer als der von 400 γ Papaverin:

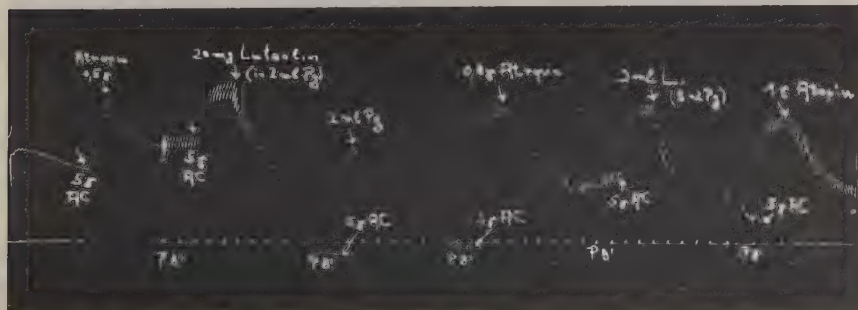
Abbildung 15



Der spasmolytische Effekt von 20 mg Luteolin und 3 ml L. (5 + 2 Pg) (siehe Seite 34) gegenüber Azetylcholinkrämpfen (auf Abbildung 16 mit AC bezeichnet) war bedeutend größer als der von 1 γ Atropin.

Wie aus den Abbildungen 15 und 16 deutlich zu ersehen ist, sind die durch Aglykone bedingten abfallenden Kurven im Gegensatz zu den Papaverin- und Atropin-Kurven unregelmäßig. Die Darmperistaltik wird nach Aglykongaben sehr schwach. Wir nehmen deshalb an, daß muskulotrope und neurotrope Spasmolyse-Wirkung der von uns getesteten Aglykone auf einen anderen Wirkungsmechanismus zurückzuführen ist als der des Papaverins bzw. des Atropins.

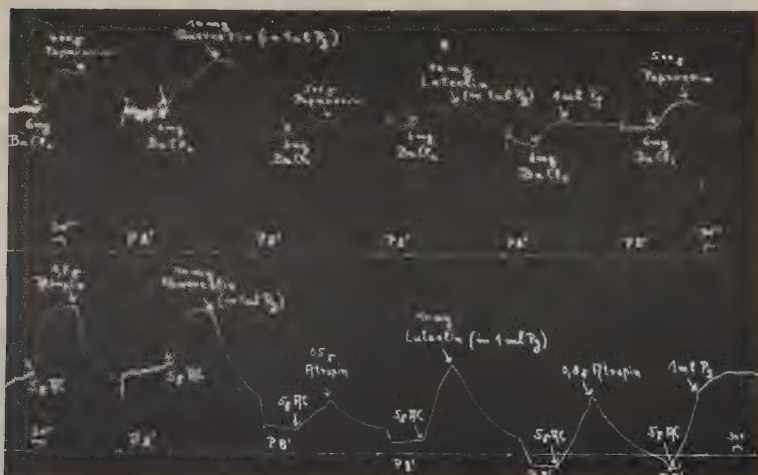
Abbildung 16



Bemerkenswert ist, daß die muskulotropen und neurotropen Spasmolyse-Effekte nicht nur auf den Apigenin-⁶²⁾ und Quercetin-Gehalt⁶³⁾ (siehe Seite 8) zurückzuführen sind, sondern auch mit Sicherheit zu einem erheblichen Teil von dem Luteolin-Gehalt erzielt werden.

Um die spasmolytische Wirkungsintensität des aus *Taraxacum* isolierten Luteolins genauer einstufen zu können, verglichen wir es mit Quercetin (Fa. Carl Roth/Karlsruhe), von dem vergleichende Daten mit Papaverin zur Verfügung standen. Und zwar wird die spasmolytische Aktivität des Quercetins von japanischen Autoren⁶³⁾ mit 2.62 angegeben bei angenommener Aktivität 1 des Papaverins. B. BORKOWSKI und K. SZPUNAR⁶⁴⁾ kamen bei ihren Arbeiten über die spasmolytische Wirkung von Flavonoiden zu dem Aktivitätsverhältnis Papaverin:Quercetin = 1:3.2, d.h. also, Quercetin erreicht ca. 35 - 50% der Papaverinwirkung, während Apigenin vergleichsweise nur bis zu 14% aufzuweisen hat. Mit Hilfe unserer Versuchsanordnungen kamen wir zu dem Schluß, daß dem Luteolin etwa die gleiche Spasmolyseaktivität zugeschrieben werden muß wie dem Quercetin.

Abbildung 17



- 62) F.SORM, Z.CEKAN u.H.RASKOVA, Chem.Listy 46, 308 (1952)
 63) S.SHIBATA, T.MURAKAMI u.Mitarb., Ref.Biuletyn IRL 5, 284 (1959)
 64) B.BORKOWSKI u. K.SZPUNAR, Pharmaz.Zentralhalle 99/6, 280 (1960)

Die krampferregenden Stoffe BaCl_2 bzw. Azetylcholin (mit AC bezeichnet) ließen wir stets eine Minute einwirken (siehe Zeitschreibung: Von Zähnchen zu Zähnchen 30 Sekunden). In allen Fällen betrug die Einwirkungsdauer der Spasmolytica zweieinhalb Minuten. Zwischen den einzelnen Versuchen war immer eine Pause von 8 Minuten (P 8') eingeschaltet. Da sowohl Quercetin als auch Luteolin jeweils in 1 ml Propylenglycol (Pg.) gelöst waren, prüften wir auch das Verhalten von Propylenglycol allein. Aus Abbildung 17 ist deutlich zu ersehen, daß Spannung und Peristaltikamplitude des Darmes durch Pg. nicht beeinflußt wurden.

Auffallend und bemerkenswert ist das Verhalten des Kaninchendünndarmes nach der spasmolytischen Quercetinwirkung. Bei muskultropen wie neurotrophen Spasmolyseversuchen sprachen BaCl_2 bzw. Azetylcholin nach Quercetingaben nicht in der gleichen, krampferregenden Weise an wie normal. Höchstens $1/4 - 1/3$ der Kurvennormalhöhe wurden erreicht (siehe Abb. 17). Nach Luteolingaben wurde dieser Effekt nicht festgestellt. Es muß deshalb angenommen werden, daß dem Quercetin neben spasmolytischen Eigenschaften auch lähmende zugeschrieben werden müssen, die es dem Darm zeitweise unmöglich machen, in normaler Form auf neue Reize anzusprechen.

DISKUS S I O N

Vor allem ist die Leber-Galle-Wirksamkeit des Löwenzahns zu diskutieren in Zusammenhang mit den dafür verantwortlichen Inhaltsstoffen. Ein pseudocholeretischer Effekt ist denkbar, bedingt durch die spasmolytischen Eigenschaften der in der Droge enthaltenen Flavonoide. Es besteht die Möglichkeit, daß durch die Spasmolysewirkung Stauungszustände behoben werden⁶⁵⁾, indem das gestörte Zusammenspiel der sympathischen und parasympathischen Innervation der Gallenblase und der Gallenwege normalisiert wird. Chronische Stauungszustände der Gallenwege rufen aber, wie K. BÖHM⁶⁵⁾ weiter ausführt, Leberparenchymschäden hervor, die ihrerseits wieder die übrigen Funktionen

65) K.BÖHM, Arzneimittelforsch. 6, 376 (1959)

der Leber negativ beeinflussen⁶⁶⁾⁶⁷⁾⁶⁸⁾⁶⁹⁾. Das von einigen Autoren⁷⁰⁾⁷¹⁾⁷²⁾ beobachtete Ansteigen der Cholerese um 40% nach Gabe von Taraxacum-Extrakt dürfte wohl auch auf die Taraxacum-Bitterstoffe zurückzuführen sein.

Da meso-Inosit und Cholin in Taraxacum officinale Web. enthalten sind, weisen wir vor allem auf den lipotropen Effekt dieser beiden Stoffe hin. Der Leberstoffwechsel wird in Bezug auf den Fetthaushalt gerade von der Kombination der beiden Stoffe 73)74)75)76) besonders günstig beeinflusst. Ferner sind die Arbeiten von M.C. GEPHARDT⁷⁷⁾, G.O. BROWN⁷⁸⁾ und G. GRAVINI⁷⁹⁾ zu erwähnen. Diese drei Autoren berichten von einer sehr günstigen Beeinflussung der Leberzirrhose durch meso-Inosit.

Von guten Wirkungen des meso-Inosits bei Lipämie und Leberdysfunktion bei Diabetikern sprechen W.C. FELCH und L.B. DOTTI⁸⁰⁾, ebenso J. POMERANCE und V. LEVINE⁸¹⁾.

-
- 66) G.GUALANDI, G.GILBERTINI, F.SQUADRINI u. L.MARCON, *Minerva med.* 45/II, 1435 (1954)
67) R.LORENZINI in M.COPPO et al., *Etipatogenesi delle epatopatie non infettive*, Milano 1954
68) M.COPPO u. A.BERENGO, *Giornate mediche Internat.*, Verona 1955
69) M.COPPO, F.SQUADRINI u. G.GILBERTINI, *Gastroenterologia* 85, 65 (1956)
70) E.CHABROL, R.CHARONNAT, M.MAXIMIN, R.WAITZ u. J.PORIN, *C.R. Soc.Biol.* 108, 1100 (1931)
71) J.BÜSSEMAKER, *Arch.exp. Path.Pharmakol.* 181, 512 (1936)
72) K.BÖHM, *Arzneimittelforsch.* 6, 377/378 (1959)
73) I.M.ARIEL, J.C.ABELS, H.T.MURPHY, G.T.PACK u. C.P.RHOADS, *Annals of Internal Medicine* 20, 4 (1944)
74) M.L.McFARLAND u. E.W.McHENRY, *J.Biol.Chem.* 159, 605 (1945), 176, 429 (1948)
75) C.I.BABORKA, *Treatment by Diet*. London 1948, 5.Edition
76) R.FISCHER, F.GEORGI u. R.WEBER, *Schweiz.med.Wschr.* 80, 129 (1950)
77) G.O.BROWN, *Postgrad.Med.* 4, 203 (1948)
78) M.C.GEPHARDT, *Ann.Int.Med.* 26, 764 (1947)
79) G.GRAVINI, *Min.Med.* 41, 491 (1950)
80) W.C.FELCH u. L.B.DOTTI, *Proc.Soc.Exp.Biol.and Med.* 72, 376 (1949)
81) J.POMERANCE u. V.LEVINE, *Rev.Gastroenterologia USA* 16, 771 (1949)

Auf Grund dieser Angaben und Befunde betonen und unterstreichen wir die Leber-Galle-Wirksamkeit von *Taraxacum officinale* Web.. Die Herstellung alkoholischer Auszüge und Extrakte der Gesamt- und vor allem aber der Blütendroge zur therapeutischen Anwendung ist empfehlenswert.

Ferner weisen wir im Zusammenhang mit Löwenzahn auf die gute Diuresewirkung des Luteolins⁸²⁾ und auf die echte Potenzierung von Vitamin C durch Flavonoide⁸³⁾ hin.

Was die Spasmolyseeffekte eines angereicherten Flavonoidkonzentrates aus *Flores Tanacetii* betrifft, so zeigte auch dieses gegenüber Azetylcholin, Histamin- und Bariumchloridkrämpfen eine deutliche Wirkung, so daß die Droge als spasmolytisch wirksam bezeichnet werden kann. Jedoch ist die praktische Anwendung und Ausnutzung durch den ätherischen Ölgehalt der Droge stark behindert wenn nicht unmöglich. Bekanntlich treten, bedingt durch den Thujongehalt im ätherischen Öl, durch Überdosen⁸⁴⁾ von Rainfarn (Normaldosis bei Wurmkur: 3 x täglich 2 - 4 g gepulverter Blütendroge) opisthotonische und trismische Krämpfe auf, die zum Exitus führen können. (Früher kam es durch große Gaben dieser Droge öfter zu Todesfällen, da der Rainfarn in der Volksmedizin als Abortivum⁸⁵⁾ Verwendung fand). Vor allen Dingen müßte also bei Verwendung des Rainfarns als Spasmolyticum das ätherische Öl entfernt werden, da bei ökonomischer Kalkulation der Droge vermutlich ziemlich hohe Dosen zur Anwendung kommen müßten.

Wir sind jedoch der Ansicht, daß der von uns schon angedeutete relativ hohe Kaliumgehalt der Rainfarnblüten (siehe Seite 21) ebenfalls bei den negativen Nebenwirkungen der Droge eine Rolle spielt, da Kalium bekanntlich ein die neuromuskuläre Erregbarkeit steigern-der und diastolischer Faktor ist.

82) A.CLERC u. R.PARIS, C.R.Soc.Biol. 133, 46 u. 49 (1940)

83) A.M.AMBROSE u. F. DeEDS, J.Nutrition 38, 305 (1949)

84) .FLAMM, Hippokrates 867 (1935)

85) .EICHLER u. .VOLLMER, "Sammlungen von Vergiftungsfällen" 7, 23

Experimenteller Teil

I. Papierchromatographie

Als Chromatographierpapier wurden die Papiere 2043 b Gl und 2043 b Gl "gewaschen" der Fa. Schleicher und Schüll, Dassel, verwendet. In der Regel wurde in Glaskammern mit den Maßen 50 x 20 x 60 absteigend chromatographiert. Die Startlinie wurde 4 cm über dem Papieranfang gezogen, da bei geringerem Abstand ein Eintauchen der Papiere in die Unterphase möglich ist. Als Sättigungsmittel der Kammern diente bei zweiphasigen Fließmitteln stets deren Unterphase, bei einphasigen das Fließmittel selbst.

Die aufsteigende Methode spielte nur als vororientierender Hinweis eine Rolle. Hierfür kamen Rundkammern zur Anwendung.

1. Fließmittelsysteme

Folgende Fließmittelsysteme kamen zur Anwendung:

- | | | |
|------------------------------------|----------------|-----------|
| a) Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser | = ÄAW (10:2:3) | Oberphase |
| b) Butanol-Eisessig-Wasser | = BEW (4:1:5) | Oberphase |
| c) Isopropanol-Ameisensäure-Wasser | = IAW (2:5:5) | einphasig |
| d) Pyridin-Äthylazetat-Wasser | = PÄW (1:2:2) | Oberphase |
| e) Essigsäure 15%ig | | einphasig |
| f) Chloroform-Benzol-Ammoniak | = CBA (1:9:1) | |

Zur Flavonglykosidtrennung wurden die Systeme a) und b) herangezogen, während sich c) vorwiegend für Aglykon-Differenzierungen empfahl. Bei Zuckern kam System d) zur Anwendung, a), b) und c) neben e) bei Pflanzensäuren. b) wurde bei der Papierchromatographie des meso-Inosits und für Alkaloide verwendet, f) bei östrogenen Stoffen.

Die Laufzeiten aller Fließmittelsysteme sind in hohem Maß temperaturabhängig. Ist z.B. die Laufzeit für ungewaschenes Papier und System b) normalerweise bei 18 - 20°C 22 - 24 Std., so ist es durchaus möglich, daß bei einer Temperatur von 28°C das Chromatogramm bereits nach 16 Std. durchgelaufen ist.

2. Sprühreagenzien

Die Chromatogramme wurden nach Entwicklung und Trocknung bei Tageslicht und unter der UV-Lampe*) betrachtet und ent-

*) UV-Quarzlampe, H.P.W. 125 (maximale Strahlung bei 366 mμ)

sprechende Anmerkungen neben den einzelnen Flecken angebracht. Dasselbe geschah dann nach dem Besprühen mit ganz bestimmten Reagenzien, die wir nachstehend aufführen.

a) 5%ige wässerige Aluminiumsulfatlösung

Dieses Reagens diente zur Charakterisierung von Flavonflecken.

b) Basische Bleiazetatlösung (ca. 25%ig)

Für den Sprühtest mit basischer Bleiazetatlösung gelangte Liquor Plumbi subaceticici DAB 6 zur Anwendung. Dieses Reagens gab in einigen Fällen durch charakteristische Farbveränderungen von Flavonflecken nützliche Hinweise.

c) 1%ige methanolische und 2%ige wässerige Eisen-3-chloridlösung

Zu dieser Reaktion ist folgendes zu bemerken: Alle Farbveränderungen von Substanzen können nur sofort nach dem Besprühen auf dem noch feuchten Papier bei Tageslicht festgestellt werden. Oft ist es auch schwierig, exakte Angaben über Farben zu machen, da sich das mit diesem Reagens besprühte Papier durch das Eisen-3-Ion sofort gelbbraun färbt.

1%ig methanolisch fand es Verwendung bei Flavonuntersuchungen, 2%ig wässerig bei Pflanzensäuren.

d) Zirkon-Zitronensäure

Dieses Reagens wurde benutzt, um die Substitutionsverhältnisse an C-3 bei Glykosid D aus Flores Tanacetii zu klären. Dabei wurde ein entwickeltes Chromatogramm mit einer 2%igen methanolischen Zirkonoxychloridlösung besprüht. Nach dem Trocknen wurde der unter dem UV-Licht gelb fluoreszierende Glykosidfleck angezeichnet und mit einer 5%igen wässerigen Zitronensäurelösung besprüht, was eine Auslöschung der Fluoreszenzfarbe zur Folge hatte. Das Papier wurde nun ca. zwei Minuten über konzentrierte Salzsäuredämpfe gehalten, um bei einer etwaigen Verglykosidierung an C-3 eine Hydrolyse herbeizuführen, die mit einer neuerlichen gelben Fluoreszenz verbunden gewesen wäre.

e) Di-o-anisidin

Dieses Reagens wurde für den Beweis einer C-7 Verglykosidierung herangezogen. Es handelt sich dabei um eine 3%ige

Lösung von Echtblausalz B der Fa. Serum-Vertrieb, Marburg, G.m.b.H..

f) Anilinphthalatlösung

Sie setzt sich zusammen aus 1.66 g o-Phthalsäure und 0.93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol. Die entwickelten und getrockneten Chromatogramme wurden sofort nach dem Besprühen in den Trockenschrank gegeben und dort bei 105°C ca. zehn Minuten belassen. Glucose zeigte sich dann bei Tageslicht als brauner Fleck (siehe S.54 - 56).

g) Ammoniakalische Silbernitratlösung

Sie diene uns zur Sichtbarmachung von meso-Inosit. Die schwarzen Reduktionsflecken dieses Stoffes zeichnen sich durch sehr niedere R_F -Werte aus (in BEW R_F 0.066).

Das Reagens besteht aus 0.85 g Silbernitrat, 24 ml 25%igem Ammoniak, Aqua dest. ad 100 ml und 4 g Natriumhydroxyd in rotulis. Nach dem nicht allzu starken Besprühen wurden die Chromatogramme noch feucht über Wasserdampf gehalten, wodurch die Reduktion zum Silber sofort eintrat. Anschließend wurden die Papiere kurz in eine 1%ige Thiosulfatlösung gelegt, um eine Schwärzung der ganzen Chromatogramme zu verhindern.

h) Diazoreagens

Das von uns für die Charakterisierung von Pflanzensäuren angewandte Reagens setzte sich aus folgenden zwei Lösungen zusammen, die kurz vor dem Besprühen zu gleichen Teilen gemischt wurden: 1. Natriumnitrit 0.5 g und Aqua dest. ad 250 ml, 2. Natriumsulfanilat 0.8 g, Aqua dest. 245 ml und 5 ml 37%ige Salzsäure.

Bevor dieses Sprühmittel zur Anwendung gelangte, wurden die Chromatogramme mit methanolischer 2n KOH besprüht und getrocknet. Farbangaben beziehen sich auf Tageslicht und noch feuchte Chromatogramme.

i) Modifiziertes Dragendorff-Reagens⁸⁶⁾

Es wurde als Alkaloid-Reagens und zur Identifizierung von

86) R.MUNIER u. M.MACHEBOEUF, Bull.Soc.Chim.biol. 33, 846 (1951)

Cholin und Perlon verwendet.

Es besteht aus zwei Lösungen:

1. 850 mg Bismutum subnitricum, 40 ml Aqua dest. und 10 ml Eisessig,

2. 8 g Kaliumjodid und 10 ml Wasser.

Vor Gebrauch werden je 5 ml der beiden Lösungen mit 20 ml Eisessig und 100 ml Aqua dest. gemischt.

Die Farben der Substanzen kommen am besten zur Geltung, wenn man die besprühten Chromatogramme langsam an der Luft trocknen läßt.

3. Präparative Papierchromatographie

Wir wandten diese Methode an, um nicht kristallisierbare Substanzen in relativ reinen Lösungen zu erhalten. Diese zogen wir dann zu UV-absorptionsspektrophotometrischen Messungen heran.

Die Substanzgemische wurden auf 40 cm breite Bogen mit einer dünn ausgezogenen Glaspipette bis zu zwanzigmal auf die Startlinie strichförmig aufgetragen. Nach Entwicklung und Trocknung der Chromatogramme wurden die einzelnen Zonen unter dem UV-Licht markiert. Wir schnitten sie dann aus und mazerierten die zerkleinerten Papierstreifen kalt in 15 - 20 ml Äthanol oder Methanol bis zu drei Tagen. Die Lösungen, die sich in Reagensgläsern befanden, wurden täglich öfters umgeschüttelt.

II. Säulenchromatographie

1. Magnesol-Säule

Wir verwendeten Glasröhren von 2 - 5 cm Durchmesser und einer Höhe von 40 cm. Am unteren Teil der Säule befand sich ein eingeschliffener Glastropfhahn. Das Magnesol^{*)} wurde zunächst einmal mit wasserfreiem Azeton angeschlemmt und nun in kleinen Mengen in die am unteren Teil mit einer gleichmäßigen Watteschicht bedeckte Säule eingefüllt. Dabei soll die Höhe

^{*)} Magnesol = Magnesiumtrisilikat der Fa. Food a. Chem. Corp., New York

des abgesetzten Magnesols 7 - 8 cm nicht übersteigen. Erstens genügt diese Höhe völlig zu einer Glykosidvorrreinigung und zweitens bleibt die Tropfgeschwindigkeit von 15 - 20 Tropfen pro Minute in einer erträglichen Grenze. Die eingeschlemmte Säule wurde mit ca. 100 ml wasserfreiem Azeton nachgewaschen. Das Einfüllen von Waschflüssigkeiten, Substanzlösungen und Elutionsmitteln muß sehr sorgfältig geschehen. Man nimmt die Lösungen in eine Pipette mit feiner Öffnung und läßt die Flüssigkeiten vorsichtig an der inneren Glaswand der Säule ablaufen. Soll nun nach den Waschflüssigkeiten die Substanzlösung aufgetragen werden, so läßt man erstere vor dem Auftragen letzterer 1 - 2 mm unter die Oberschicht des Füllmaterials sinken. Die oberste Schicht wird durch diesen Vorgang gefestigt und somit ein Aufwirbeln des eingeschlemmten Pulvers vermieden. Das Füllmaterial von Säulen soll einen völlig glatten und ebenen Abschluß haben, innerhalb der Füllmasse dürfen sich keine Luftbläschen oder Hohlräume befinden. Auch kleinste Fehler dieser Art haben ein Zipfeln der einzelnen Substanzzonen zur Folge. Die Fraktionierung wird dadurch sehr erschwert. Einen Fehler der Säule behebt man durch Aufrühren der Füllung mit einem Glasstab.

Wir lösten 0.5 g Mischkristallisat in 15 - 20 ml wasserfreiem Azeton, eluierten mit 250 ml wassergesättigtem Äthylacetat und fraktionierten zu 5 x 50 ml.

Magnesol-Säulen bewirkten in unserem Fall eine gute Vorreinigung der Glykoside.

2. Polyamid-Säule

Als Füllmaterial wählten wir Ultramid K 228/ BM 2, BASF, Ludwigshafen. Wir ließen das Pulver zunächst 24 Stunden in Aqua dest. quellen, gaben es dann auf eine mit groben Filterpapier abgedichtete Nutsche und wuschen es mit reichlichen Mengen Aqua dest., heißem 80%igem Methanol und wieder mit Aqua dest. durch. Nun wurde es in die Säulen bis zu einer Höhe von 35 cm eingeschlemmt und nochmals in derselben Reihenfolge gewaschen. Nachdem die Glykosidlösungen aufgetragen waren, ließen wir solange Aqua dest. durch die Säulen laufen, bis das

austropfende Wasser unter dem UV-Licht keine blaue Fluoreszenz mehr zeigte. Nun begannen wir die Säulen mit einer 5%igen methanolischen Lösung zu beschicken und steigerten alle 100 ml den Methanolgehalt um 5%. Diese Methode hat den Vorteil, daß sich in der Säule keine Risse bilden und weitere Pflanzensäuren entfernt werden.

Bei einem Methanolgehalt von 60% begannen sich die Glykosidzonen, die bisher im ersten sechstel der Säule verblieben waren, in Bewegung zu setzen. 75 - 80%iges Methanol bewirkte dann schon eine erhebliche Wanderung und ein Sichtbarwerden von mehreren Glykosidzonen. 0.5 g durch Magnesol-Säulen vorgereinigtes Mischkristallisat fraktionierten wir zu 10 x 100 ml.

3. Aluminiumoxyd-Säule

Verwendet wurde Al_2O_3 "Woelm" neutral Aktivitätsstufe 1. Wir schlämmten in eine 1 m hohe Säule mit 6 cm lichter Weite zunächst gewaschenes Ultramid bis zu einer Höhe von 30 cm ein. Auf die durch Einsickernlassen von Wasser gefestigte Oberschicht legten wir eine 2 cm hohe Watteschicht, die durch Befechten und vorsichtiges Drücken mit einem Glasstab geglättet wurde. Nun schlämmten wir das mit Aqua dest. gewaschene Aluminiumoxyd bis zu einer Höhe von 30 cm darauf, so daß jetzt das Füllmaterial insgesamt 60 cm hoch in der Säule stand.

Das Aluminiumoxyd genügte, um einen wässerigen Extrakt von einem kg Trockendroge flavonfrei zu machen. Die wässrige Lösung fraktionierten wir zu 30 x 100 ml, die darauf folgende methanolische zu 5 x 100 ml.

4. Zellulose-Säule

Wir orientierten uns zunächst über die drei Zellulose-Arten, die uns zur Verfügung standen. Dabei stellte sich heraus, daß "Ederol" Nr. 221 der Fa. J.C. Binzer, Hatzfeld/Eder weitaus den Zellulosepulvern der Firmen Schleicher und Schüll bzw. Macherey und Nagel überlegen war. Erstens konnte es in die Säulen eingeschlämmt werden, während bei den anderen bei-

den Pulvern ein mühevolleres Stopfen notwendig war. Bei "Ederol" war kein Quellen notwendig und es konnte ohne zu verkleben mit allen Arten von organischen Lösungsmitteln und Wasser beschickt werden. "Ederol" gewährleistete eine angenehme Tropfgeschwindigkeit bis zu 60 Tropfen/Minute auch bei 35 cm hohen Säulen. Ferner ging aus den beiden anderen Zellulosepulvern mit wassergesättigtem Äthylazetat und Butanol z.B. zwanzig mal mehr in Lösung als aus "Ederol". Das spezifische Gewicht von "Ederol" betrug das Doppelte verglichen mit dem anderer Zellulosepulver. Bei gleicher Füllhöhe ist also das Doppelte an "Ederol" in der Säule, was auf eine exaktere Trennung hoffen läßt.

Bei unseren Glykosid-Trennversuchen mußten wir allerdings bei allen drei Zellulosearten feststellen, daß "Gossypitrin" und "gossypitrinartige Körper" sowie ein hoher Prozentsatz an "Quercimeritrin" an Zellulose irreversibel adsorbiert bleiben. Die Fraktionen 7, 8, 9 und 10 (siehe Seite 13) wurden hierzu vereinigt, auf 20 ml eingeeengt und auf die Säule gegeben. Wir versuchten nun mit je 500 ml Methanol, wassergesättigtem Äthylazetat, Butanol, Azeton und Zusätzen von Eisessig bzw. Ameisensäure die Flavonoide zu eluieren.

III. Dünnschichtchromatographie

Wir verwendeten glatte Spiegelglas-Platten von der Größe 12 x 20 cm und von 4 mm Dicke. Pro Platte wurden 5 g Kieselgel G (Merck) mit 9 ml Wasser angerieben und mit einem Metallstreicher, der in einer Glasschiene lief (Desaga-Heidelberg) gleichmäßig über die Platte verteilt. Darauf folgte eine Trocknung bei 105°C. Die Startpunkte wurden 2 cm über dem Plattenrand und 2.5 cm von einander entfernt mit einer Nadel markiert und das mit Chloroform (1:10) verdünnte ätherische Öl mit einer feinen Kapillare dünn aufgetragen. Wir stellten die Platten dann in eine gut verschließbare Rundkammer, in der ca. 1 cm hoch Chloroform stand. Nach einer halben Stunde war das Fließmittel vom Startpunkt aus gerechnet 13 cm hoch gestiegen. Nun wurden die Platten aus den Kammern genommen, an der Luft getrocknet und anschließend besprüht:

- a) Mit einer gesättigten Lösung von Antimon-3-chlorid in Chloroform,

b) mit 20 Teilen Antimon-5-chlorid in 80 Teilen Tetrachlorkohlenstoff.

Die noch feuchten Platten wurden dann fünf Minuten bei 110°C getrocknet. Zur Sichtbarmachung der einzelnen Bestandteile des ätherischen Öles aus den Rainfarnblüten bewährte sich Reagens b) sehr gut. Sieben rot-gelbe Farbflecke waren deutlich sichtbar.

Kieselgel-Platten verwendeten wir auch bei unseren chromatographischen Untersuchungen über östrogene Stoffe in Flores und Radix Taraxaci. Neben unbehandelten Platten und Chloroform als Fließmittel kamen auch Platten zur Anwendung, die wir vor dem Auftragen mit einer 50%igen äthanolischen Formamidlösung besprüht hatten. Aufgetragen wurden die im Vakuum stark eingeeengten Petrol-ätherausschüttelungen aus den wässrigen Extrakten von Flores und Radix Taraxaci. Als Testsubstanzen dienten Östradiol und Östron. Die in Benzol-Chloroform (4:1) gelaufenen Platten wurden mit Reagens a) besprüht und noch feucht fünf Minuten in den Trockenschrank bei 110°C gegeben.

Eine Übereinstimmung der "Taraxacum Östrogene" (R_f 0.91, unbesprüht braun, besprüht rotbraun) mit den von uns verwendeten Testsubstanzen (R_f 0.81 bzw. 0.96, unbesprüht purpurrot, besprüht gelborange) wurde nicht erzielt.

IV. Herstellung des wässrigen Extraktes

Den Ausgangspunkt für alle chromatographischen Untersuchungen oder Isolierungen bildete stets der wässrige Extrakt der Drogen. In allen Fällen wurden die von uns bearbeiteten Drogen-teile am besten durch eine methanolische Extraktion im Soxhlet-apparat ausgenutzt (2 l Methanol auf 100 g Trocken-Droge).

Die vorher schonend getrockneten und zerkleinerten Pflanzenteile wurden so lange extrahiert, bis das abgelaufende Methanol völlig farblos war. Dann destillierten wir das Methanol bis auf einen Rest von etwa einem halben Liter ab, gaben die doppelte Menge Aqua dest. hinzu und destillierten so lange, bis alles Methanol entfernt war. Nun konnten wir nach dem Erkalten der Lösung den größten Teil des Chlorophylls, das sich plattenförmig als zäh-klebrige Masse an der Oberfläche abgeschieden hatte, abheben.

Die Lösung wurde darauf wieder erhitzt und noch heiß durch grobporiges Papier filtriert. Dieses Filtrat bildete den wässerigen Extrakt (1 l aus einem kg Trockendroge).

Bei Flavonisolierungen empfiehlt es sich die Lösung mit Bikarbonat zu neutralisieren, auf das doppelte Volumen mit Aqua dest. zu verdünnen, 24 Stunden in den Eisschrank zu stellen und dann nochmals zu filtrieren.

V. Bleifällungen

2 l wässerigem Extrakt aus 2 kg Flores Taraxaci setzten wir so lange eine gesättigte wässrige Lösung von Plumbum aceticum DAB 6 zu, bis bei weiterer Zugabe kein Niederschlag mehr entstand. Die Fällung wurde ebenso wie die darauf folgende in der Wärme vorgenommen, um einen groben, leicht abfiltrierbaren Niederschlag zu erhalten. Nach Filtration wurde dem Filtrat Bleiessig zugesetzt bis ebenfalls nichts mehr ausfiel. Beide Niederschläge wurden getrennt sorgfältig mit Aqua dest. ausgewaschen und 12 Stunden zum Abtropfen beiseite gestellt. Jede der beiden Fällungen wurde nun mit einem Liter 50%igen Athanol angeschlemmt. Durch Einleiten von Schwefelwasserstoff wurden die Bleikomplexe in Lösung gebracht und das Blei als Bleisulfid gefällt. Dieses wurde abfiltriert. Durch die Filtrate leiteten wir 10 Minuten CO_2 und engten im Vakuum bis auf ca. 50 ml ein. Papierchromatographisch stellten wir nun in beiden Lösungen die gleichen Säuren fest. Die vereinigten Lösungen wurden, wie schon beschrieben, durch eine Aluminiumoxyd-Perlon-Säule gegeben.

Bei unseren Isolierungen von meso-Inosit aus den einzelnen Drogenteilen von Taraxacum officinale arbeiteten wir gleichfalls mit der Bleimethode, da auch Inosit ausfällbare Bleikomplexe bildet. Der erste Niederschlag, der durch die gesättigte Bleiazetat-Lösung entstand, wurde verworfen, die zweite Fällung durch Bleiessig mittels Ammoniak vervollständigt. Dieser Niederschlag wurde wie schon vorher beschrieben behandelt. Die auf 50 ml eingeeengte, Pb- , $\text{H}_2\text{S-}$ S- und NH_3 -freie Lösung gossen wir noch heiß in 500 ml Methanol, dem wir 30 ml Äther zugesetzt hatten. Meistens entstand sofort ein Niederschlag von meso-Inosit, in einigen Fällen bildeten sich erst nach 24-stündigem Stehen im Eisschrank Kristalle, die

zum größten Teil an der Gefäßwand hafteten. Die Substanz wurde abgenutscht, mit ca. 50 ml reinem Methanol gewaschen, in wenig Aqua dest. gelöst und aus einer Mischung von 30 ml 70%igem Methanol + 5 ml Äther + 5 ml Eisessig so oft umkristallisiert, bis sie schmelzpunktrein war.

VI. Ausschüttelungen

Wir schüttelten bei unseren Flavonisolierungsversuchen aus Flores Taraxaci 2 l wässrigen Extrakt (gewonnen aus einem kg Trockendroge) 30 mal mit je 200 ml Äther aus, 30 mal mit 500 ml wassergesättigtem Äthylazetat und anschließend 10 mal mit 200 ml wassergesättigtem Äthylazetat-Methanol (9:1). Eine Wassersättigung wurde jeweils durch 10-minütiges Schütteln im Scheidetrichter mit einem Überschuß an Wasser erzielt. Die Ausschüttelungen wurden stets 2 - 3 mal mit Aqua dest. zurückgeschüttelt, mit getrocknetem Na_2SO_4 versetzt und durch trockenes Papier filtriert. Da die Vorfraktionierung der Glykoside durch diese Aufeinanderfolge von organischen Lösungsmitteln unwesentlich verlief und wir auch nur spärliche Mengen von Mischkristallisat gewinnen konnten, änderten wir die Methode bei unseren Untersuchungen über die Flavonglykoside aus Flores Tanaceti. Einen Liter wässrigen Extrakt schüttelten wir zunächst 5 mal mit 500 ml Petroläther aus, um Fettstoffe, Harze und Chlorophyllreste zu entfernen. Darauf folgten 30 Ausschüttelungen mit je einem Liter wassergesättigtem Äthylazetat. Nach Zurückschütteln mit Wasser und Trocknen durch Na_2SO_4 engten wir das Äthylazetat auf etwa einen Liter ein und stellten zur Mischkristallisatbildung 72 Stunden in den Kühlschrank. Aus 2.5 kg Trockendroge gewannen wir 4.21 g Mischkristallisat, das nach Lösung in der schon beschriebenen Weise an Magnesol-, Ultramid- und Zellulose-Säulen chromatographiert wurde.

VII. Hydrolysen

Wir verwendeten zu allen Hydrolysen stets nur vorgereinigte und mit Flavonen angereicherte Lösungen bzw. isolierte Reinsubstanz. 2%ige HCl genügte meistens vollkommen, um auch C-7 Glykoside in 3 - 5 Stunden auf offener Flamme zu hydrolysieren. Dabei wurden 10 - 20 ml methanolischer Glykosidlösung mit ebensoviel Aqua dest. versetzt und bis zur vollständigen Entfernung des Me-

thanols erhitzt, da wir die Erfahrung gemacht hatten, daß die Temperatur bei Hydrolysen methanolischer Lösungen manchmal nicht ausreichte. Diese wässerige Glykosidlösung wurde nun mit 25%iger Salzsäure auf einen Gehalt von 2% HCl gebracht und in einem 50 ml Azetylierkölbchen mit Rückflußkühler der Hydrolyse unterworfen. Es ist zu bemerken, daß ein teilweises Ausfallen der Glykoside beim Überführen von der methanolischen in die wässerige Phase keinen Einfluß auf die Vollständigkeit der Hydrolyse hatte. Nach dem Erkalten trennten wir die Aglykone durch Ausschütteln mit Äther von der sauren, wässrigen Lösung, in der sich die Zucker befanden. Säureanteile entfernten wir durch Ausschütteln mit Aqua dest. aus der ätherischen Lösung, die dann durch ein trockenes Papierfilter gegeben, bis zur Trockene eingedampft und in 10 ml Methanol aufgenommen wurde. Diese Lösung benutzten wir zu papierchromatographischen Untersuchungen der Aglykone. Um die Aglykone kristallin zu erhalten, verdünnten wir die Lösung bis zu 30 ml mit 50%igem Methanol und stellten sie in den Kühlschrank.

Versagte die eben beschriebene Hydrolysen-Methode, erhöhten wir den Gehalt an HCl bis zu 8% und hydrolysierten bis zu 10 Stunden. Auch 3-, 5- und 10%ige Schwefelsäure wurde angewendet und ein Verfahren nach H. KILIANI⁸⁷⁾, bei dem die "Spaltsäure" aus 35 ml Eisessig, 55 ml Wasser und 10 ml konz. Salzsäure bestand. Wir konnten jedoch bei den Glykosiden A und B aus Flores Tanacetii auch mit diesem Verfahren nicht zum Ziel gelangen.

Bei der q u a n t i t a t i v e n H y d r o l y s e von Luteolin-7-glucosid aus Flores Tanacetii wurden 40.9 mg Glykosid genau gewogen und anschließend bei ca. 110°C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Hydrolysiert wurde drei Stunden mit 2%iger Salzsäure auf offener Flamme. Die Hydrolyseflüssigkeit erhitzen wir nur bis zu gelindem Sieden. Nach 24-stündigem Verbleiben der Lösung im Kühlschrank filtrierten wir das ausgefallene Aglykon mit einer konstant getrockneten und gewogenen Mikrofilternutsche G 3. Die Substanz wurde mit 10 ml

87) H.KILIANI, Ber.dtsch.chem.Ges. 63, 2866 (1936)

Aqua dest. gewaschen, bei ca. 110°C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ihr Gewicht bestimmt (siehe S. 55).

VIII. Papierchromatographische Zuckeruntersuchungen und Osazon-Darstellung

Schwefelsaure, wässrige Hydrolyseflüssigkeiten wurden mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ neutralisiert und nach dem Abfiltrieren des Bariumsulfates auf ca. 0.5 ml eingengt. Diese Zuckerlösung konnte dann zu papierchromatographischen Untersuchungen und zur Osazondarstellung verwendet werden. Die Chromatogramme wurden in Pyridin-Äthylazetat-Wasser (1:2:2) entwickelt und nach dem Trocknen mit Anilinchthalatlösung besprüht (siehe S. 42).

In allen anderen Fällen neutralisierten wir die sauren Hydrolyseflüssigkeiten mit dem Ionenaustauscher Dowex 2^{*)} nach der Methode von K.A. PIETZ⁸⁸⁾ und Mitarbeiter. Um die Austauscher-
masse in die Bikarbonatform überzuführen, schlämmten wir 100 g des groben Pulvers zunächst mit Aqua dest. in eine Glassäule. Wir wuschen mit 50 ml n KOH vor, 50 ml n HCl, reichlich Aqua dest. und Äthanol. Nun wurde durch die Säule solange gesättigte, 70% äthanolische Natriumhikarbonatlösung gegeben, bis die austropfende Lösung alkalische Reaktion zeigte. Danach wuschen wir die Austauschersäule mit 70%igem Äthanol neutral. Durch das so aktivierte Pulver wurde die saure Hydrolysenflüssigkeit mit einer Geschwindigkeit von 20 - 25 Tropfen pro Minute gegeben. Die neutralisierte Zuckerlösung engten wir dann ebenfalls auf ca. 0.5 ml ein und verwendeten sie zu papierchromatographischen Untersuchungen und zur Osazon-Darstellung.

Letztere führten wir durch, indem wir die 0.5 ml Zuckerlösung mit dem gleichen Volumen frisch bereiteter Phenylhydrazinlösung^{**)} versetzten und das Reagensglas mit den beiden Lösungen eine Stunde im siedenden Wasserbad beließen. Nach 15-minütiger

88) K.A.PIETZ, E.B.TOOPER u. L.S.FODSICK, J.biol.Chemistry 194, 669 (1952)

*) Dowex 2, Fa. Dow, Chemical International Ltd.

**) Phenylhydrazinhydrochlorid 1 g
Natriumazetat 1.5 g
Aqua dest. ad 10 ml

Abkühlung an der Luft hatten sich meist schon einige gelbe Kristallnadeln ausgeschieden, deren Schmelzpunkt entsprach. Manchmal zog sich die Auskristallisation jedoch bis zu 12 Stunden hin. Wir filtrierten dann ab, wuschen mit wenig Wasser nach und kristallisierten das Osazon aus reinem Äthanol um.

IX. Azetylierungen

Die Azetate der Aglykone wurden auf folgende Weise hergestellt: Etwa 20 mg Substanz wurden mit der gleichen Menge getrocknetem Natriumazetat p.a. und ca. 3 ml Essigsäureanhydrid am Rückflußkühler zwei Stunden so erhitzt, daß ein stetiges und gelindes Sieden gewährleistet war. Anschließend gossen wir die noch heiße Flüssigkeit in 30 ml eiskaltes Aqua dest., stellten drei Stunden in den Eisschrank, filtrierten das Azetat ab, wuschen mit reichlich Aqua dest. nach und kristallisierten aus reinem Äthanol (5 ml) mehrmals um.

100 mg meso-Inosit azetylierten wir 15 Stunden und verfahren sonst wie oben. Vor dem Umkristallisieren klärten wir noch mit 50 mg Kohle.

X. UV-absorptionsspektrophotometrische Untersuchungen mit Natriumazetat und Borsäure/Natriumazetat

Zunächst wurden methanolische (p.a.) Stammlösungen von den zu messenden Substanzen hergestellt, deren Konzentration ca. 10^{-4} mol war. 5 ml dieser Lösung wurden dann 3 Minuten mit einem Überschuß an wasserfreiem Natriumazetat p.a. geschüttelt, filtriert und anschließend gemessen.

3 ml gesättigte, methanolische Borsäurelösung wurden mit 3 ml der Stammlösung und einem Überschuß an wasserfreiem Natriumazetat 3 Minuten geschüttelt, filtriert und nach 15 Minuten gemessen.

XI. Untersuchungsmethoden

Alle Schmelz- und Mischschmelzpunkte sind korrigiert. Sie wurden mit dem Mikroschmelzpunktsapparat nach Kofler bestimmt.

Für die UV-absorptionsspektrophotometrischen Messungen verwendeten wir den Zeiss Opton-Spektralphotometer M 4 Q. Die Lösungen wurden in geeigneter Konzentration bei einer Schichtdicke von 1 cm in Quarzglasküvetten gemessen.

Die IR-Spektren wurden im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 gemessen. Hierzu wurden die Substanzen nach dem Trocknen im Hochvakuum in Form von Preßlingen verwendet.

Elementaranalysen und CH_3CO -Bestimmungen wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr ausgeführt.

XII. Spezielle experimentelle Befunde

1. Luteolin aus Flores Taraxaci

Aus 1 kg schonend an der Luft getrockneter, in der Nähe von St. Heinrich (Starnberger See) gesammelter Löwenzahnblüten erhielten wir in der schon beschriebenen Weise (siehe S. 8) 103 mg Substanz, die papierchromatographisch mit authentischem Luteolin übereinstimmte. Die R_f -Werte betrugen in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) 0.80, in Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5) 0.34.

Der Schmelzpunkt betrug $328 - 330^\circ\text{C}$. Das Azetylprodukt schmolz bei $223 - 225^\circ\text{C}$. G. KLEIN⁸⁹⁾ gibt für Luteolin einen Schmelzpunkt von $328 - 329.5^\circ\text{C}$ bzw. $329 - 330^\circ\text{C}$ an, für sein Azetat $222 - 224^\circ\text{C}$.

UV-Absorptionsmaxima:

Max₁ Max₂

Gef.: 350 m μ 255 m μ

Luteolin nach C.G. NORDSTRÖM u. T. SWAIN⁹⁰⁾ : 351 m μ 256 m μ

Das IR-Spektrum der Substanz (Konzentration 1005 γ / 300 mg KBr bzw. 500 γ / 300 mg) ist auf Seite 9 abgebildet.

Elementaranalyse: Luteolin (286) $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$

Einwaage mg	Abnahme im Hoch- vakuum, mg	Trockengew. mg	CO_2 mg	H_2O mg
4.245	0.143	4.102	9.33	1.28
	Gef.: 62.07%	3.49% H		
	Ber.: 62.90%	3.49% H		

89) G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse" II, Bd. III, S. 863, Wien 1932

90) C.G. NORDSTRÖM u. T. SWAIN, J. chem. Soc. (London) 2764 (1953)

Zucker-Bestimmung

Wie schon beschrieben, wurde Luteolin nach der Hydrolyse der Gesamtglykoside aus Flores Taraxaci isoliert. Die hier angegebene Zuckerbestimmung bezieht sich also auf alle Taraxacum-Glykoside.

Die neutralisierte Hydrolyseflüssigkeit wurde absteigend in Pyridin-Äthylazetat-Wasser (1:2:2) chromatographiert. Nach Besprühen mit Anilinphthalatlösung zeigte sich ein brauner Fleck mit dem R_F -Wert 0.51, der mit authentischer Glucose übereinstimmte.

Das Osazon wurde in der schon beschriebenen Weise dargestellt (siehe Seite 51). Der Schmelzpunkt betrug 202 - 203°C. Nach N.R. BANNERJEE⁹¹⁾ schmilzt Glucoseosazon unter Zersetzung bei 205°C.

2. Luteolin-7-glucosid aus Flores Tanacetii

Aus 2.5 kg getrockneten Flores Tanacetii (2 kg bezogen von der Fa. H.Unfried, München, 0.5 kg selbst gesammelt bei Ismaning) isolierten wir in der schon beschriebenen Weise 107 mg Substanz. Papierchromatographisch stimmte sie mit authentischem Luteolin-7-glucosid überein. Die R_F -Werte betrugen in BEW 0.40, in AAW 0.36 und in IAW 0.44 (siehe Seite 14).

Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 255 - 257°C.

H. NAKAMURA und Mitarbeiter⁹²⁾ geben für Luteolin-7-glucosid 258°C an.

UV-Absorptionsmaxima:

	Max ₁	Max ₂
Glykosid D aus Flores Tanacetii:	351 mμ	257 mμ
Luteolin-7-glucosid nach K. PEACH und M.V. TRACEY ⁹³⁾ ;	350 mμ	259 mμ

Im Borsäure-Natriumazetat-Milieu trat eine bathochrome Verschiebung auf, und zwar bei Max₁ von +26, bei Max₂ von

91) N.R.BANNERJEE, Proc.Indian Acad.Sci. 44A, 284 (1956)

92) H.NAKAMURA, T.OHTA u. G.HUKUTI, ref.in Chem.Zbl. II, 3801 (1936)

93) K.PEACH u. M.V.TRACEY, "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd. III, S. 487, Bln.-Gött.-Heidelbg. 1955

+6, was den Angaben von L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern⁹⁴⁾ entsprach.

Das IR-Spektrum der Substanz (Konzentration 1090 γ / 300 mg KBr) ist auf Seite 15 abgebildet.

Elementaranalyse: Luteolin-7-glucosid (448) $C_{21}H_{20}O_{11}$

Einwaage mg	Abnahme im Hoch- vakuum, mg	Trockengew. mg	CO ₂ mg ²	H ₂ O mg
4.159	0.188	3.971	8.13	1.62
	Gef.: 55.87%C	4.57%H		
	Ber.: 56.25%C	4.46%H		

Quantitative Hydrolyse: (Ausführung siehe Seite 50)

Einwaage mg	konstant getrocknete Auswaage, mg	% Aglykon gef.	% Luteolin ber.
40.9	25.3	61.85	63.84

Zuckerbestimmung

Die neutralisierte, eingeeengte Hydrolyseflüssigkeit wurde absteigend in PÄW chromatographiert. Nach Besprühen mit Anilinphthalatlösung zeigte sich ein brauner Fleck mit dem R_f -Wert 0.51 in völliger Übereinstimmung mit authentischer Glucose. Das Osazon (Darstellung siehe Seite 51) hatte einen Schmelzpunkt von 207°C.

Aglucon-Bestimmung

Das Aglucon stimmte papierchromatographisch mit authentischem Luteolin überein (R_f 0.80 in BEW, 0.34 in IAW). Es schmolz bei 324 - 326°C, sein Azetylprodukt bei 224 - 227°C. Die UV-Maxima lagen bei 350 und 256 m μ .

Chemische Reaktionen siehe Seite 14 und 41 .

3. Luteolin aus der Hydrolyse der Gesamtglykoside von Flores Tanacetii

Aus 0.5 kg Trockendroge isolierten wir in der schon beschriebenen Weise (siehe Seite 16 und 43) 78 mg Substanz. Sie stimmte papierchromatographisch mit authentischem Lu-

94) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. F.GLOGGENGIESSER, Arch.Pharmaz.Ber. dtsh.pharmaz.Ges. 291/63, 133 (1958)

teolin überein. Ihr Schmelzpunkt betrug 329°C , das Azetylprodukt schmolz bei $223 - 224^{\circ}\text{C}$.

Die UV-Maxima lagen bei 350 und 255 m μ .

Das IR-Spektrum der Substanz (Konzentration 1240 γ /300 mg KBr bzw. 400 γ / 300 mg) ist auf Seite 17 abgebildet.

Elementaranalyse: Luteolin (286) $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$

Einwaage mg	Abnahme im Hoch- vakuum, mg	Trockengew. mg	CO_2 mg	H_2O mg
4.135	0.233	3.902	8.87	1.27
	Gef.: 62.04%C	3.64%H		
	Ber.: 62.90%C	3.49%H		

Zuckerbestimmung

Papierchromatographisch war der Zucker mit Glucose identisch. Das Osazon hatte einen Schmelzpunkt von $203 - 204^{\circ}$. Da es sich um eine Hydrolyse der Gesamtglykoside aus Flores Tanaceti gehandelt hatte, ist somit festgestellt, daß als Zuckerkomponente aller Tanacetum-Glykoside nur Glucose vorhanden ist.

4. Meso-Inosit aus Taraxacum officinale Web.

Aus 1 kg trockener Blütendroge, die wir in der Nähe von Dachau gesammelt hatten, isolierten wir in der schon beschriebenen Weise (siehe Seite 48) 1.109 g Substanz. Sie hatte in BEW einen R_f -Wert von 0.066 in Übereinstimmung mit authentischem meso-Inosit und reduzierte ebenso wie dieser ammoniakalische Silbernitratlösung. Der Schmelzpunkt betrug $222 - 225^{\circ}\text{C}$, das Azetylprodukt schmolz bei $215 - 217^{\circ}\text{C}$. E.J. ROWE und Mitarbeiter⁹⁵⁾ geben $224 - 225^{\circ}\text{C}$ bzw. $215 - 216^{\circ}\text{C}$ an.

Elementaranalyse der azetylierten Substanz: $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ (432)

Gef.:	50.43%C	5.46%H
Ber.:	50.00%C	5.56%H

95) E.J. ROWE, A.A. HARWOOD u. D.B. MYERS, J. Amer. pharmac. Assoc. 44, 308 (1955)

Azetylgruppenbestimmung:

Gef.: 55.59%CH₃CO *)
Ber.: 59.72%CH₃CO

Die Substanz war optisch inaktiv (Konz.: 500 mg -m-I.
Aqua dest ad 10 ml)

Das IR-Spektrum der Substanz (Konz.: 1000 γ / 150 mg
KBr) und von meso-Inosit (Merck) (Konz.: 1000 γ / 150 mg
KBr) ist auf Seite 19 abgebildet.

Elementaranalyse: meso-Inosit (180) C₆H₁₂O₆

Gef.: 39.84%C 6.89%H
Ber.: 40.00%C 6.67%H

Chemische Identitäts-Reaktionen siehe Seite .

5. Daten des Kaulquappen-Testes mit meso-Inosit
(Aufzucht der Tiere siehe Seite 24).

Gesamtgewicht der Tiere:

	Glas I	Glas II	Glas III	Glas IV
1. Versuchstag:	983 mg	992 mg	989 mg	996 mg
15. Versuchstag:	5.427 g	5.761 g	6.319 g	5.473 g
22. Versuchstag:	4.011 g	4.309 g	4.820 g	4.041 g

Gegliederte Hinterbeine in %:

	Glas I	Glas II	Glas III	Glas IV
22. Versuchstag:	10	20	50	10
27. Versuchstag:	30	50	75	25
30. Versuchstag:	50	55	85	35
32. Versuchstag:	55	60	90	45
34. Versuchstag:	65	70	95	55
36. Versuchstag:	70	85	100	60

*) Der schlechte CH₃CO-Wert dürfte auf Schwierigkeiten bei der
Verseifung zurückzuführen sein.

Vorderbeine in %:

	Glas I	Glas II	Glas III	Glas IV
26. Versuchstag:	0	5	20	0
27. Versuchstag:	0	5	20	0
30. Versuchstag:	10	15	50	5
32. Versuchstag:	20	25	65	15
34. Versuchstag:	25	35	70	25
36. Versuchstag:	45	55	75	40

6. Angaben über die Spasmolyse-Teste

- a) 50 ml wässriger Extrakt (siehe Seite 47) aus 30 g Flores Taraxaci wurden am isolierten Meerschweinchen-dünndarm getestet. Die Lösung hatte einen pH-Wert von 3.26. Vergleichende Experimente mit Salzsäure, pH 3.26, zeigten mit gleicher und noch höherer Dosierung keine Reaktion am Meerschweinchendünndarm.

Azetylcholin-Test

5 - 25 ml/l Bad obiger Lösung bewirkten auf 10 γ /l Bad Azetylcholin keine Hemmung. dagegen wurde die Spontantätigkeit des Darmes bei allen Dosierungen aufgehoben.

Histamin-Test

25 ml/l Bad bewirkten auf 25 γ /l Bad Histamin keine Hemmung, dagegen wurde auch hier die Spontantätigkeit des Darmes mit der Lösung unterbunden.

Bariumchlorid-Test

25 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 50 mg/l Bad BaCl_2 um ca. 25%

50 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 50 mg/l Bad BaCl_2 um ca. 95%

- b) Aus 100 g Flores Taraxaci bereiteten wir 100 ml wässrigen Extrakt (siehe Seite 47), gaben 5 ml konz. H_2SO_4 zu und hydrolysierten 3 Stunden. Nach Neutralisation mit Bariumhydroxydlösung filtrierten wir und engten die Lösung auf 50 ml ein. Diese Lösung wurde am isolierten Meerschweinchendünndarm getestet.

Azetylcholin-Test

5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 10 γ AC/l Bad um ca. 25%

12.5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 10 γ AC/l Bad um ca. 95%

Histamin-Test

5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 25 γ Histamin/l Bad um ca. 25%

12.5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 25 γ Histamin/l Bad um ca. 95%

Bariumchlorid-Test

2.5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 20 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 25%

5.0 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 20 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 95%

- c) Aus 50 g Flores Tanaceti bereiteten wir 100 ml wässrigen Extrakt, schüttelten mit 10 x 50 ml Äthylazetat aus, destillierten bis auf ca. 50 ml ab, gaben ca. 70 ml Aqua dest. zu und erhitzen solange auf dem Dampfbad, bis alles Äthylazetat abgedunstet war. Die durch Zugabe von Wasser auf 50 ml gebrachte Lösung wurde am isolierten Meerschweinchendünndarm getestet.

Azetylcholin-Test

5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 7.5 γ AC/l Bad um ca. 25%

12.5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 7.5 γ AC/l Bad um ca. 60%

Histamin-Test

5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 20 γ Histamin/l Bad um ca. 50%

12.5 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 20 γ Histamin/l Bad um ca. 95%

Bariumchlorid-Test

1.25 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 20.8 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 10%

2.50 ml/l Bad obiger Lösung hemmten 20.8 mg BaCl_2 /l Bad um ca. 50%

Bei den von uns selbst durchgeführten Bestimmungen verwendeten wir Kaninchendünndarmausschnitte. Die Arbeiten wurden in Tyrodelösung in einem 40 ml Gefäß bei Sauerstoffzufuhr und 37°C durchgeführt. Mit einem Darmausschnitt wurden jeweils 6 - 7 Testungen vorgenommen (siehe Seite 34). Neben Luteolin wurde die Lösung (L.) auf ihre Spasmolysewirksamkeit getestet. Dabei handelte es sich um 100 ml wässrigen Extrakt aus 50 g Flores Taraxaci, den wir mit 5%iger Schwefelsäure drei Stunden hydrolysiert, anschließend mit Bariumhydroxydlösung neutralisiert und nach der Filtration auf 50 ml eingeengt hatten. Die Lösung wurde im Verhältnis 4 + 2 ml Propylenglykol bzw. 5 + 2 ml mit "Pg" versetzt. Von diesen nun klaren Lösungen wurden zur Entkrampfung 2 - 3 ml eingesetzt. Wir ließen die krampferregenden Bariumchlorid- bzw. Azetylcholinlösungen jeweils eine Minute einwirken, die spasmolytischen Lösungen 2.5 - 3 Minuten (siehe Seite 35 und 36 Zeitschreibung: Von Punkt zu Punkt jeweils 30 Sek.). Dann spülten wir mit Tyrodelösung gut durch. Bis zur nächsten Krampferregung wurde stets eine Pause (P) von 8 Minuten eingelegt.

L e b e n s l a u f

Am 22. Juli 1932 wurde ich, Helmut B e r b e r i c h , als Sohn des Apothekers Franz Berberich und seiner Ehefrau Katharina geb. Buchholz, in München geboren.

1937 zog die Familie nach Regensburg. Nach Besuch der ersten vier Klassen Volksschule trat ich im Herbst 1943 in das Alte Gymnasium Regensburg ein und legte im Juni 1952 die Reifeprüfung ab.

Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Elefanten-Apotheke, Regensburg, bestand ich im September 1954 das pharmazeutische Vorexamen. Im November 1954 nahm ich an der Universität München das Studium der Pharmazie auf und schloß dieses im Mai 1958 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen ab. Am 3. Juni 1959 erhielt ich die Bestallung als Apotheker.

Im Januar 1959 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer.

